

Aus dem Bereich Biochemie und Molekularbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

KIF5C,  
ein neuer Bindungspartner für die  
Proteinkinase CK2

*Dissertation*  
*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*  
der  
Medizinischen Fakultät  
der  
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2008

vorgelegt von

Dipl. Biol. Barbara Schäfer  
Geb. am 16. Februar 1979 in Völklingen

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
aa	amino acid
Ade	Adenin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
CK2	Proteinkinase CK2
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	Tag
D	Aspartat
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

His	Histidin
IP	Immunpräzipitat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
Leu	Leucin
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MD	Motordomäne
NMD	Nicht-Motordomäne
NP40	Nonidet P40
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidendifluorid
S	Serin
SD	Single Dropout
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SV 40	Simian Virus 40
T	Threonin
Taq	Thermus Aquaticus
TBB	Tetrabromobenzimidazol
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
UV	Ultraviolett
VP	Vorpräzipitat
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

## Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Summary	3
3.	Einleitung	5
4.	Material	13
4.1	Chemikalien und Materialien	13
4.2	Radiochemikalien	14
4.3	Enzyme	14
4.4	Geräte	15
4.5	Gebrauchsfertige Reaktionskits	15
4.6	Nährmedien für Bakterien	15
4.7	Nährmedien für Hefen	16
4.8	Molekulargewichtsmarker	16
4.8.1	DNA-Molekulargewichtsmarker	16
4.8.2	Protein-Molekulargewichtsmarker	16
4.9	Antikörper	17
4.9.1	Primäre Antikörper	17
4.9.2	Sekundäre Antikörper	17
4.10	Bakterienstämme	17
4.11	Hefestamm	18
4.12	Primer	18
4.13	Plasmide	18
4.14	Puffer und Lösungen	19
4.15	Computersoftware	24
5.	Methoden	26
5.1	DNA-Methoden	26

---

5.1.1	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
5.1.2	Mutagenisierung von DNA	26
5.1.3	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	27
5.1.4	Horizontale DNA-Agarosegelelektrophorese	27
5.1.5	Isolation von DNA aus Agarosegelen	27
5.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
5.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	28
5.1.8	Erzeugung von chemisch kompetenten Bakterien	28
5.1.9	Erzeugung von elektrokompenten Bakterien	28
5.1.10	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	29
5.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	29
5.1.12	<i>In vitro</i> Translation	30
5.2	Zellbiologische Arbeitsmethoden	30
5.2.1	Zelllinien	30
5.2.2	Zellkulturbedingungen	31
5.2.3	Einfrieren von Säugerzellen	31
5.2.4	Auftauen von Säugerzellen	32
5.2.5	Beseitigung von Kontaminationen	32
5.2.6	Transfektion von HEK-293 Zellen mit der Calciumphosphat-Methode	32
5.2.7	Transfektion von COS-1 Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode	33
5.2.8	Radioaktive <i>in vivo</i> Markierung von Proteinen	33
5.2.9	Kultivierung von hippocampalen Neuronen	34
5.2.10	Präparation von Astrocyten	34
5.2.11	Präparation von hippocampalen Neuronen	34
5.3	Proteinchemische Arbeitsmethoden	35
5.3.1	Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i>	35
5.3.2	Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit GSH-Sepharose	35
5.3.3	Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen	36

---

---

5.3.4	Das Baculovirus Expressionssystem	36
5.3.5	Kultivierung von Sf9 Zellen	37
5.3.6	Infektion von Sf9 Zellen	37
5.3.7	Vermehrung von Baculoviren	37
5.3.8	Proteinexpression in Sf9 Zellen	37
5.3.9	Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose unter nativen Bedingungen	38
5.3.10	Herstellung von Gesamtzellextrakten	38
5.3.11	Herstellung von Cytoplasmafraktionen aus Säugerzellen	38
5.3.12	Herstellung von Cytoplasmafraktionen aus Maushippocampus	39
5.3.13	Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose	39
5.3.14	Proteinbestimmung	40
5.3.15	Fällung von Proteinen	40
5.3.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
5.3.17	Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	41
5.3.18	Autoradiographie	41
5.3.19	Westernblot	41
5.3.20	Immunologischer Nachweis der Proteine	42
5.3.21	Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Säugerzellen	42
5.3.22	Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Gewebeschnitten	43
5.3.23	<i>In vitro</i> Kinasereaktion mit der Proteinkinase CK2	43
5.3.24	Bestimmung von Phosphorylierungsstellen mit Peptidfiltern	44
5.3.25	Aktivitätsbestimmung der CK2 in Zellextrakten und am Immunpräzipitat	44
5.3.26	ATPase-Versuch unter „steady state“ Bedingungen	45
5.4	Hefe-Techniken	46
5.4.1	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	46
5.4.2	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
5.4.3	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
5.4.4	X-Gal-Test	47
5.4.5	Plasmidisolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48

6.	Ergebnisse	49
6.1	Die Aufarbeitung der Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung gegen die katalytische $\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2	49
6.2	Das der Kinesin Heavy Chain Familie zugehörige KIF5C ist ein Interaktionspartner der katalytischen $\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2	50
6.3	Die Identifikation der Bindungsregion der katalytischen CK2-Untereinheiten innerhalb des Motorproteins KIF5C	51
6.3.1	Herstellung der benötigten DNA-Konstrukte	52
6.3.2	Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen	52
6.4	Die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und die Mauszelllinie NSC34 enthalten KIF5C	53
6.5	Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums gegen KIF5C	54
6.5.1	Das Kaninchenserum #976 ist im Westernblot spezifisch gegen KIF5C gerichtet	55
6.5.2	Das Serum #976 kann KIF5C aus Cytoplasmaextrakten von SH-SY5Y Zellen präzipitieren	58
6.5.3	Das Serum #976 kann KIF5C in Immunfluoreszenz-Untersuchungen nachweisen	59
6.6	Die Untereinheiten der Proteinkinase CK2 sedimentieren im Sucroседichte-gradient in den gleichen Fraktionen wie KIF5C	61
6.7	Die Fraktionen des Sucrosegredienten, in denen KIF5C und die Untereinheiten der Proteinkinase CK2 kosedimentieren, enthalten eine Kinaseaktivität	63
6.8	KIF5C ist mit der Proteinkinase CK2 in SH-SY5Y Zellen kolokalisiert	64
6.9	KIF5C kann mit der Proteinkinase CK2 <i>in vivo</i> kopräzipitiert werden	66
6.10	<i>In vitro</i> Bindungsstudien mit KIF5C und CK2	69
6.10.1	Herstellung der benötigten DNA-Konstrukte, Proteinexpression und Reinigung	69
6.10.2	KIF5C kopräzipitiert <i>in vitro</i> nur mit CK2 $\alpha'$	71
6.11	Eine Differenzierung von SH-SY5Y Zellen führt nicht zu einer Lokalisationsänderung der Proteinkinase CK2 oder von KIF5C	74
6.12	KIF5C und die Proteinkinase CK2 im Rückenmark	77
6.12.1	Die Lokalisierung von KIF5C und der Proteinkinase CK2 im Rückenmark	78

---

6.12.2	KIF5C ist im Rückenmark mit der Proteinkinase CK2 kolokalisiert	79
6.13	KIF5C und die Proteinkinase CK2 in Hippocampusneuronen	81
6.13.1	KIF5C und die Proteinkinase CK2 werden im Hippocampus von Mäusen exprimiert	81
6.13.2	Detektion von Neuronen	82
6.13.3	Lokalisations-Untersuchungen zu KIF5C und der Proteinkinase CK2 in Hippocampusneuronen	83
6.13.4	KIF5C und die Proteinkinase CK2 sind in Hippocampusneuronen kolokalisiert	84
6.14	FRET-Untersuchungen einer <i>in vivo</i> - Interaktion von KIF5C und den katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2	85
6.14.1	Herstellung der benötigten Konstrukte und Expressionskontrolle	86
6.14.2	Lokalisationsuntersuchung der FRET-Konstrukte	88
6.14.3	FRET-Messung von KIF5C und den katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2	90
6.15	Phosphorylierungsuntersuchungen zu KIF5C	91
6.15.1	KIF5C wird <i>in vitro</i> von der Proteinkinase CK2 und der freien katalytischen $\alpha'$ -Untereinheit phosphoryliert	91
6.15.2	KIF5C wird <i>in vivo</i> von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert	93
6.16	Die Identifikation der CK2-Phosphorylierungsstellen von KIF5C	94
6.16.1	Herstellung der benötigten DNA-Konstrukte, Proteinexpression und Reinigung	95
6.16.2	Die Nicht-Motordomäne von KIF5C wird <i>in vitro</i> von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert	97
6.16.3	Die Identifikation der CK2-Phosphorylierungsstellen von KIF5C mit Hilfe von Peptidfiltern	98
6.17	Untersuchungen zur Phosphorylierung von KIF5C durch die Proteinkinase CK2 mit Hilfe von Phosphorylierungsmutanten	100
6.17.1	Herstellung der benötigten DNA-Konstrukte, Proteinexpression und Reinigung	100
6.17.2	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von KIF5C und seiner Phosphomutanten durch die Proteinkinase CK2	101



6.18	Der Einfluss von KIF5C auf die Kinaseaktivität Proteinkinase CK2	103
6.19	Der Einfluss von KIF5C auf die Kinaseaktivität von CK2 $\alpha'$	105
6.20	Der Einfluss der Mutagenisierung auf die ATPase-Aktivität von KIF5C	106
7. Diskussion		108
8. Literaturverzeichnis		122

## 1. Zusammenfassung

Seit ihrer Entdeckung vor über 50 Jahren konnte die Proteinkinase CK2 in den unterschiedlichsten Lebensformen von den Protozoen bis hin zum Menschen identifiziert werden. Es handelt sich bei der Proteinkinase CK2 um eine ubiquitär vorkommende Kinase, die bevorzugt Serin- und Threoninreste innerhalb ihrer Substrate phosphorylieren kann. Das Holoenzym der CK2 besteht im Allgemeinen aus zwei regulatorischen  $\beta$ - und zwei katalytischen  $\alpha$ - und/oder  $\alpha'$ -Untereinheiten. Zwar kennt man bis zum heutigen Zeitpunkt über 300 Substrate und zahlreiche Interaktionspartner der CK2, jedoch ist ihre Funktion in der Zelle weitgehend ungeklärt. Von besonderem Interesse in Bezug auf die Aufklärung ihrer zellulären Aufgaben sind die katalytischen CK2-Untereinheiten, da man annehmen muss, dass sie unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben können.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung mit der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2 als Fänger aufgearbeitet, um möglicherweise neue Interaktionspartner zu identifizieren, die spezifisch nur mit einer Untereinheit interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass das neuronale Motorprotein KIF5C, welches verstärkt in Motoneuronen exprimiert wird und zusammen mit seinen beiden Familienmitgliedern KIF5A und KIF5B der Kinesin-1 Familie zugeordnet wird, ein Interaktionspartner der katalytischen  $\alpha$ - und  $\alpha'$ -Untereinheit im Hefe-Zwei-Hybrid-System ist. Die Region der Interaktion mit den beiden katalytischen CK2-Untereinheiten konnte der Motordomäne von Aminosäure 1 bis 335 innerhalb der Polypeptidkette von KIF5C zugeordnet werden. Diese Interaktion konnte in *in vitro* Koimmunpräzipitations-Untersuchungen jedoch nur für die katalytische  $\alpha'$ -Untereinheit bestätigt werden. Weder für die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit, die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit noch für ein CK2 Holoenzym aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten konnte eine Assoziation gezeigt werden.

Auf der Suche nach einem geeigneten zellulären System konnten die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und die motorneuronalen Zelllinie NSC 34 positiv für KIF5C und die Proteinkinase CK2 getestet werden. Eine Sucroседichtegradienten-Zentrifugation ergab eine Sedimentation sämtlicher CK2-Untereinheiten und KIF5C in der gleichen Fraktion. In Koimmunpräzipitations-Analysen am Cytoplasmaextrakt von SH-SY5Y Zellen konnte eine Assoziation von KIF5C mit sämtlichen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 nachgewiesen werden. Eine Koimmunfluoreszenz-Analyse in SH-SY5Y Zellen, in differenzierten SH-SY5Y

Zellen, am Rückenmark und in primären Neuronen aus dem Hippocampus von Mäusen zeigte eine Kolokalisation von KIF5C mit der Proteinkinase CK2. Dabei kolokalisierte die katalytische  $\alpha'$ -Untereinheit der CK2 deutlicher mit KIF5C als mit den beiden anderen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$ .

Phosphorylierungsuntersuchungen von KIF5C zeigten, dass KIF5C sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert wurde, obwohl *in vitro* keine Assoziation der beiden Proteine festgestellt werden konnte. KIF5C wurde außerdem *in vitro* von der katalytischen  $\alpha'$ -, nicht jedoch von der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit phosphoryliert. Die Identifikation der möglichen Phosphorylierungsstellen mit Hilfe von bakteriell exprimierten KIF5C-Fragmenten beschränkte den Ort einer möglichen Phosphorylierung auf die Nicht-Motordomäne (AS 336 - 957) von KIF5C. Eine nähere Untersuchung mit Hilfe von Peptidfiltern ergab eine Phosphorylierungsstelle an der Aminosäure Threonin 338 innerhalb der Polypeptidkette von KIF5C. Durch Mutation dieser Aminosäure zu Alanin und Aspartat konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um die einzige Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase CK2 handelt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zugabe steigender Mengen von KIF5C keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität des CK2-Holoenzym ausübt. Eine Zugabe steigender Mengen von KIF5C scheint sich jedoch inhibierend auf die Kinaseaktivität der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit auszuwirken. Eine Untersuchung bezüglich des ATPase-Aktivität von KIF5C ergab, dass bakteriell exprimiertes KIF5C den höchsten ATP-Umsatz pro Zeiteinheit aufwies, wohingegen das in Insektenzellen exprimierte KIF5C den geringsten ATP-Umsatz pro Zeiteinheit zeigte.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit KIF5C ein neuer Interaktionspartner der Proteinkinase CK2 identifiziert werden, bei dem es sich um einen spezifischen Interaktionspartner der katalytischen Untereinheiten handelt. Es bestehen Hinweise, dass KIF5C bevorzugt an die katalytische  $\alpha'$ -Untereinheit der CK2 bindet. Eine Publikation von Teilen dieser Arbeit ist in Vorbereitung.

## 2. Summary

Since its discovery more than 50 years ago the protein kinase CK2 could be identified in the most different organisms from protozoa to human. The protein kinase is a ubiquitously expressed kinase that preferentially phosphorylates serine- and threonine residues among its substrates. The holoenzyme of CK2 usually consists of two regulatory  $\beta$ - and two catalytic  $\alpha$ - and/or  $\alpha'$ -subunits. Up to now more than 300 substrates and many interacting-partners of the CK2 are known, but its function in the cell is mostly unknown. Of special interest in revealing its cellular properties are the catalytic subunits of CK2 because they can exhibit different functions in the cell.

In this work a previously performed yeast-two-hybrid screen against the catalytic  $\alpha$ -subunit of the protein kinase CK2 was worked up to identify new possible interacting partners that specifically interact with only one of the subunits. It was shown that the neuronal motorprotein KIF5C, which is strongly expressed in motoneurons and which constitutes with its family members KIF5A and KIF5B the Kinesin-1 family, is an interacting partner of the catalytic  $\alpha$ - and  $\alpha'$ -subunit in the yeast-two-hybrid system. The region of KIF5C interacting with both of the catalytic subunits was mapped in the motordomain from aminoacid 1-335 within the polypeptide chain of KIF5C. This interaction was confirmed by *in vitro* pull-down experiments only for the catalytic  $\alpha'$ -subunit. Neither an association with the catalytic  $\alpha$ -subunit, the regulatory  $\beta$ -subunit nor with the CK2 holoenzyme consisting of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits was detected.

Searching for a suitable cellular system, the neuroblastoma cell line SH-SY5Y and the motoneuronal cell line NSC 34 were positively tested for KIF5C and the protein kinase CK2. A sucrose density gradient revealed the subunits of CK2 and KIF5C in the same fraction. Co-immunoprecipitation analyses on cytoplasmic extract from SH-SY5Y cells showed an association from KIF5C with all three subunits of protein kinase CK2. A co-immune fluorescence analysis on SH-SY5Y cells, on differentiated SH-SY5Y cells, on spinal cord and on primary hippocampal neurons of mice revealed a localization of KIF5C with the protein kinase CK2. The co-localization signal seemed more intensive between KIF5C and the catalytic  $\alpha'$ -subunit of CK2 than with the two other subunits CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ .

Phosphorylation analyses of KIF5C showed that KIF5C is phosphorylated by protein kinase CK2 *in vitro* and *in vivo*, although an association of both proteins could not be detected. KIF5C was also phosphorylated *in vitro* by the catalytic  $\alpha'$ - but not by the catalytic  $\alpha$ -subunit. The identification of possible phosphorylation sites with the help of bacterially expressed parts of KIF5C restricted the phosphorylation to the non-motordomain (aa 336-957) of KIF5C. A closer observation with the help of peptide filters showed a possible phosphorylation site at amino acid threonine 338 on the polypeptide chain of KIF5C. Mutations of this amino acid to alanine and aspartate revealed, that this was not the only phosphorylation site for CK2. It was shown that increasing amounts of KIF5C did not disturb the kinase activity of the CK2-noloenzyme. But increasing amounts of KIF5C seemed to inhibit the kinase activity of the catalytic  $\alpha'$ -subunit. An examination of the ATPase activity of KIF5C resulted in the observation that bacterially expressed KIF5C had the greatest activity in hydrolyzing ATP per time unit and KIF5C expressed in insect cells had the lowest ATPase-activity.

In this work KIF5C could be identified as a new interacting partner for protein kinase CK2, which is a specific interacting partner for the catalytic subunits. There are hints, that KIF5C favourably binds to the catalytic  $\alpha'$ -subunit of CK2. A publication of parts of this work is in progress.

### 3. Einleitung

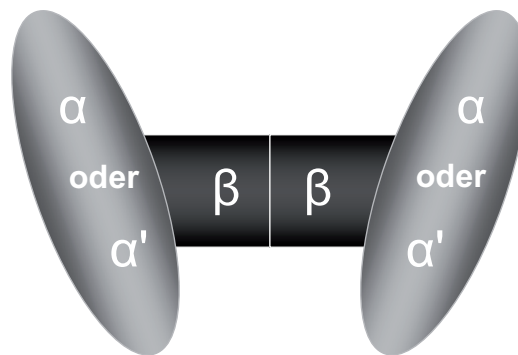
Die Regulation von zellulären Prozessen, sei es nun ein einzelliger oder vielzelliger komplexer Organismus, ist ein strikt geregelter Mechanismus, der auf vielfältige Art erfolgen kann. Werden die in der Zelle ablaufenden Reaktionen nicht korrekt geregelt, kann diese Fehlregulation zu Krankheit oder sogar zum Tod des betreffenden Organismus führen. Wichtige Schlüsselenzyme dieser vielfältigen Regulationsmechanismen stellen hierbei die Kinasen dar, die Phosphatgruppen auf die unterschiedlichsten Substrate übertragen und somit die Substrate in Bezug auf ihre Konformation und Aktivität beeinflussen können. Eine solche Phosphorylierung kann auch auf die Bindungseigenschaften eines Substrates Einfluss nehmen, insofern dass das Substrat Bindungen mit anderen Molekülen eingeht und dies zu völlig neuen Eigenschaften des Substrates führen kann.

Die Proteinkinase CK2 -oder Caseinkinase 2, wie man sie früher wegen des von ihr phosphorylierten Caseins nannte- wurde 1954 von Burnett und Kennedy entdeckt. Zwar sind seitdem über 50 Jahre vergangen, jedoch liegt die zelluläre Funktion der Proteinkinase CK2 und deren Regulation weitgehend im Dunkeln. Sie wird zusammen mit ihrem Familienmitglied CK1 der Gruppe der CMCG-Kinasen zugeordnet, zu der die cyclinabhängigen Kinasen (Cdk's), die mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die Caseinkinasen (CK) und die Glycogensynthase Kinase-3 (GSK-3) gehören (Hanks & Hunter, 1995). Die Proteinkinase CK2 ist eine ubiquitär in der Zelle vorkommende Phosphotransferase, die in der Lage ist neben den Aminosäuren Serin und Threonin auch die Aminosäure Tyrosin zu phosphorylieren (Kuenzel *et al.*, 1987; Pinna, 1990; Wilson *et al.*, 1997; Marin *et al.*, 1990). Die allgemeine minimale Konsensussequenz wird definiert als S/T-x-x-E/D (Meggio *et al.*, 1994, Songyang *et al.*, 1996), was bedeutet, dass sich nach dem zu phosphorylierenden Serin bzw. Threonin an der Aminosäureposition n+3 eine saure Aminosäure wie z.B. ein Aspartat oder Glutamat befinden sollte. Sie wird weiterhin als eine konstitutiv aktive Proteinkinase beschrieben, welche als Phosphatgruppendonatoren sowohl ATP als auch GTP verwenden kann (Hathaway & Traugh, 1983; Jakobi & Traugh, 1995; Niefind *et al.*, 1999). Die Regulation der Proteinkinase CK2 erfolgt unabhängig von zyklischen Nukleotiden (Hathaway & Traugh, 1982), Calcium-Ionen scheinen sich hingegen fördernd auf die Aktivität der CK2 auszuüben (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1991; Blanquet,

1998). Auch freie  $Mg^{2+}$ - Ionen und monovalente Kationen werden für die Kinaseaktivität der CK2 benötigt (Hathaway & Traugh, 1982; Edelman *et al.*, 1987).

Bei der Proteinkinase CK2 handelt es sich um eine evolutionär alte Phosphotransferase. So kann sie zwar nicht in Prokaryonten nachgewiesen werden, doch ist es möglich sie angefangen von einfachen Protozoen über Pilze, Pflanzen bis hin zu den höheren Säugetieren und dem Menschen zu detektieren (Faust & Montenarh, 2000).

Das Holoenzym der Proteinkinase CK2 besteht bei vielen höheren Organismen aus zwei regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten und zwei katalytischen  $\alpha$ - und/oder  $\alpha'$ -Untereinheiten (Stigare *et al.*, 1993) (Abb. 1). Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen und molekularbiologischen Methoden konnte der dreidimensionale Aufbau des CK2 Holoenzym als Heterotetramer und der Aufbau der einzelnen Untereinheiten identifiziert werden. So dimerisieren die beiden regulatorischen CK2 $\beta$ -Untereinheiten über eine Zink-Finger-Domäne miteinander. Die beiden katalytischen Untereinheiten binden an dieses  $\beta$ -Dimer, ohne dass sie jedoch selbst miteinander interagieren (Gietz *et al.*, 1995; Litchfield *et al.*, 1996; Kusk *et al.*, 1999; Chantalat *et al.*, 1999).



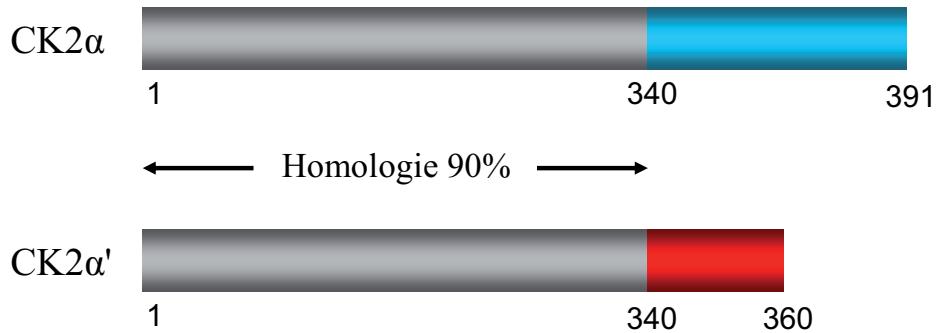
**Abbildung 1:** Schematische Struktur des Holoenzym der Proteinkinase CK2 bestehend aus 2 regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten (dunkel-grau) und zwei katalytischen  $\alpha$ - und/oder  $\alpha'$ -Untereinheiten (hell-grau).

Die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2 besitzt mehrere Aufgaben innerhalb des Holoenzym. So ist sie essentiell für die Bildung und Stabilität des funktionsfähigen Holoenzym (Meggio *et al.*, 1992). Des Weiteren ist sie zwar selbst inaktiv, sie steigert

jedoch durch ihre Bindung an die katalytischen Untereinheiten deren Aktivitäten um das 5 bis 10-fache. Sie vermittelt die Substratspezifität und kann die Phosphotransferaseaktivität des Holoenzym gegenüber vielen Substraten positiv beeinflussen. Außerdem besitzt sie die beiden Autophosphorylierungsstellen Serin 2 und Serin 3 (Litchfield *et al.*, 1991), deren Phosphorylierung die Kinaseaktivität des Holoenzym im Bezug auf einige ihrer Substrate inhibieren kann (Boldyreff *et al.*, 1993). Zusätzlich befindet sich eine Phosphorylierungsstelle bei Serin 209, an der die regulatorische CK2 $\beta$ -Untereinheit zellzyklusabhängig von p34<sup>cdc2</sup> phosphoryliert werden kann (Litchfield *et al.*, 1995; Götz *et al.*, 2005)

Die katalytischen  $\alpha$ - und  $\alpha'$ -Untereinheiten sind hoch konserviert und besitzen viele Gemeinsamkeiten. So werden beide durch die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit und durch Polyamine und Polyanionen in ihrer Aktivität reguliert (Hathaway *et al.*, 1980; Hathaway & Traugh, 1984 a, b; Leroy *et al.*, 1997). Außerdem besitzen beide eine Phosphotransferaseaktivität, die sich jedoch von der des Holoenzym unterscheidet. Die Proteinsequenz im Bereich der ersten 340 Aminosäuren zeigt eine Homologie von etwa 90% (Abbildung 2). Die Röntgenstrukturanalyse enthüllt eine bilobale Struktur für die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit, so wie es für alle bisher untersuchten Kinasen charakteristisch ist. Es besteht jedoch auch eine Anzahl von Unterschieden, welche bei der Identifikation der einzelnen katalytischen Untereinheiten von Nutzen sein können. So werden die beiden katalytischen Untereinheiten auf verschiedenen Chromosomen kodiert (Yang-Feng *et al.*, 1991; Boldyreff *et al.*, 1992) und besitzen unterschiedliche Molekulargewichte ( $\alpha$ : 42 kDa,  $\alpha'$ : 38 kDa) aufgrund der unterschiedlichen Polypeptidkettenlänge der einzelnen Untereinheiten. Auch hat sich gezeigt, dass die katalytische  $\alpha'$ -Untereinheit gegenüber Hitze stabiler und gegenüber Salzen sensibler ist im Vergleich zur katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit (Tiganis *et al.*, 1993; Antonelli *et al.*, 1996).





**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der katalytischen  $\alpha$ - und  $\alpha'$ - Untereinheiten.

Die grauen Bereiche kennzeichnen, die Region mit hoher Homologie, die farbigen Bereiche kennzeichnen die Region mit geringer Homologie. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäuren der Proteine.

Ein Versuch, die Rolle der Proteinkinase CK2 in der Zelle genauer zu untersuchen, war die Identifikation ihrer Substrate und deren Funktion innerhalb einer Zelle. Dieser Versuch führte bis heute zu einer Fülle von über 300 Substraten (Pinna & Meggio, 1997; 2003), die an den verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt sind, wie beispielsweise der Wachstumskontrolle, der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie, der Regulation der Transkription und der Signaltransduktion. In den wenigsten Fällen konnte jedoch eine eingehende Untersuchung dieser Substrate einen genaueren Bezug zur eigentlichen Regulation der Proteinkinase CK2 herstellen.

Die Überexpression, die Herunterregulation oder das komplette Ausschalten eines Proteins können weitere Strategien darstellen, die biologische Relevanz eines Proteins innerhalb einer Zelle oder eines Organismus zu untersuchen. Am Beispiel der Bäckerhefe konnte gezeigt werden, dass ein „knock-out“ der katalytischen Untereinheiten zum Absterben der Zelle führt, wohingegen eine temperaturinduzierbare Mutation der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit zu einer geänderten Zellmorphologie führt (Rethinaswami *et al.*, 1998). Bei Spaltheffen kann bei einer Überexpression der CK2 $\beta$ -Untereinheit eine Inhibition des Zellwachstums beobachtet werden, wohingegen eine CK2 $\alpha$ -Überexpression keinen Effekt zeigt (Rousseau & Draetta, 1994). In murinen Neuroblastomzellen wurde durch ein „knock-down“ der katalytischen CK2 $\alpha$ -Untereinheit durch Antisense-Oligonukleotide das Neuritenwachstum gehemmt (Ulloa *et al.*, 1993). Ähnliches konnte bei einem „knock-down“ der Proteinkinase CK2 in Zellen beobachtet werden, bei denen auch nach Stimulation durch den „Epidermal Growth Factor“

kein Wachstum zu erkennen ist (Pepperkok *et al.*, 1991). Somit kann eine Beteiligung der Proteinkinase CK2 am Wachstum von Zellen und der Aufrechterhaltung der individuellen Zellgestalt bewiesen werden. Eine Transfektion mit der kinaseinaktiven Form der katalytischen  $\alpha'$ -Untereinheit zeigt eine Attenuierung der Zellproliferation, wohingegen eine Transfektion der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit nicht zu diesem Ergebnis führt (Vilk *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Beobachtung, dass eine Überexpression der katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 zu einer erhöhten Proliferationsrate von Zellen führt (Orlandini *et al.*, 1998).

Bei dem Versuch die katalytischen und regulatorischen Untereinheiten in einem Säugetier auszuschalten, stieß man jedoch schnell an Grenzen. So führte das Ausschalten des Gens für die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit im Modellorganismus Maus zu keinen lebensfähigen Nachkommen (Lou *et al.*, 2008). Ähnliches wurde beim „knock-out“ der regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit beobachtet; die Embryonen starben *in utero* bereits im Frühstadium der Entwicklung. Auch der Versuch embryonale Stammzellen dieses „knock-outs“ zu entnehmen und *in vitro* zu kultivieren, scheiterte (Buchou *et al.*, 2003). Einzig ein Ausschalten der katalytischen  $\alpha'$ -Untereinheit führte zu lebensfähigen Mäusen mit einem unauffälligen Phänotyp. Bei genauerer Betrachtung konnte jedoch festgestellt werden, dass alle männlichen Mäuse infertil waren und unter Oligospermie und Globozoospermie litten (Xu *et al.*, 1999; Escalier *et al.*, 2003). Dies könnte darauf hindeuten, dass die katalytischen Untereinheiten verschiedene Aufgaben innerhalb eines Organismus einnehmen, jedoch die  $\alpha$ -Untereinheit eine metabolisch wichtigere Rolle spielt und ein Fehlen der  $\alpha'$ -Untereinheit teilweise kompensieren kann. Im Gegensatz zur Depletion der Proteinkinase CK2 führte eine Überexpression der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit in transgenen Mäusen zu einem deutlich vergrößerten Risiko Lymphome auszubilden (Seldin & Leder, 1995). Somit scheint eine Überexpression der katalytischen Untereinheiten in Säugerzellen mit einer höheren Proliferations- und Transformationsrate einherzugehen. Gestützt wird diese Annahme durch Untersuchungen an Tumoren und stark proliferierenden Geweben (z.B. embryonales Gewebe), wo sowohl eine höhere Expressionsrate als auch eine erhöhte CK2-Aktivität im Vergleich zu Normalgeweben zu beobachten ist (Prowald *et al.*, 1984, Münstermann *et al.*, 1990).

Ausgehend von der Beobachtung, dass nur ein „knock-out“ der katalytischen  $\alpha'$ -Untereinheit zu einem lebensfähigen Organismus führt, stellt sich die Frage, ob das Überleben bzw. die

Letalität der einzelnen Deletionsmutanten auf ein gewebespezifisches Expressionsmuster der einzelnen CK2-Untereinheiten zurückgeführt werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die einzelnen CK2-Untereinheiten in allen untersuchten Geweben exprimiert werden (Xu *et al.*, 1999). Da eine Untersuchung der Proteinexpression der einzelnen CK2-Untereinheiten auf der Ebene von Geweben zu keinem spezifischen Verteilungsmuster führte, könnte eine Proteinlokalisierung auf subzellulärer Ebene mögliche Einblicke auf die Funktion der Proteinkinase liefern. In Untersuchungen, bei der die CK2-Aktivität an Zellorganellen mit Hilfe seines Substratpeptids oder mit Casein bestimmt wurde, konnte die Proteinkinase CK2 von den Nucleoli über den Zellkern, dem Zytoskelett, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum, den Centrosomen und der Zellmembran detektiert werden (Faust & Montenarh, 2000). Auch außerhalb der Zelle gelang der Nachweis der CK2, wo sie als Ektokinase Signalübertragungen durch Rezeptoren beeinflussen kann (Walter *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2005). Durch den Einsatz von Antikörpern, die spezifisch gegen die einzelnen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 gerichtet sind, konnten jedoch in der Immunhistochemie deutliche Unterschiede in der subzellulären Lokalisation festgestellt werden. Ein Beispiel für die unterschiedliche Lokalisierung der CK2-Untereinheiten innerhalb der Zelle zeigte eine Veröffentlichung von Faust *et al.* aus dem Jahr 2001. So konnten am rauen endoplasmatischen Retikulum nur die katalytischen Untereinheiten detektiert werden, nicht jedoch die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit. Auch bei weiterführenden Untersuchungen an den Centrosomen konnte festgestellt werden, dass die dort festgestellte CK2-Aktivität allein von den katalytischen Untereinheiten hervorgerufen wird und die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit nicht nachzuweisen ist (Faust *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte durch Transfektionsexperimente von Fluoreszenz-markierten CK2 Untereinheiten auch gezeigt werden, dass die Untereinheiten unabhängig voneinander in den Zellkern transportiert werden, ein stabiles heterotetrameres Holoenzym jedoch nicht in den Kern gelangt. Es konnte auch festgestellt werden, dass sich die Untereinheiten sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma zu einem Holoenzym assemblieren können (Filhol *et al.*, 2003; Theis-Febvre *et al.*, 2005)

Ein weiterer Versuch die Regulation der Proteinkinase CK2 zu untersuchen, beschäftigt sich mit der Bildung von supramolekularen Aggregationsformen in Abhängigkeit von steigenden Salzkonzentrationen im umgebenden Milieu. So wurde *in vitro* beobachtet, dass zwischen einer Salzkonzentration von 0.1 bis 0.4 M die Proteinkinase CK2 als tetrameres Holoenzym, als ringförmige Struktur bestehend aus zwei Holoenzymen oder als dickes oder dünnes

Filament aus mehreren Holoenzymen vorliegen kann. So konnte bei einer Salzkonzentration von 0.25 M und dem Vorliegen einer hochmolekularen Molekül-aggregation die höchste CK2-Aktivität gemessen werden (Valero *et al.*, 1995; Pagano *et al.*, 2005; Niefind & Issinger, 2005). Es ist aber fraglich, ob man diese *in vitro* Ergebnisse auf Grund der hohen Konzentrationen an Salz auch *in vivo* findet.

Ein anderer viel versprechender Ansatz bei der Erforschung der Proteinkinase CK2 beschäftigt sich mit der Identifikation von möglichen Interaktionspartnern, die im Idealfall spezifisch an einzelne Untereinheiten der CK2 binden können. Doch ähnlich wie bei dem Versuch, die Funktion der CK2 in der Zelle über ihre Substrate zu klären, konnten in kurzer Zeit eine Fülle von Interaktionspartnern identifiziert werden (Glover, 1998; Guerra & Issinger, 1999). Doch diese Untersuchungen konnten widerlegen, dass die Proteinkinase CK2 in der Zelle nur als heterotetrameres Holoenzym vorliegt, so wie es lange Zeit angenommen wurde, sondern auch freie Untereinheiten existieren können (Stigare *et al.*, 1993). So konnte am Beispiel des Wachstumssuppressors p53 gezeigt werden, dass es sich hierbei zwar um ein Substrat der CK2 handelt (Meek *et al.*, 1990; Herrmann *et al.*, 1991), dass jedoch auch die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit der CK2 an p53 binden kann, ohne dass die katalytischen Untereinheiten benötigt werden (Filhol *et al.*, 1992). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Bindung einerseits die Transaktivierungsfähigkeit von p53 beeinflussen (Schuster *et al.*, 1999), als auch die Aktivität der Proteinkinase CK2 inhibieren kann (Schuster *et al.*, 2001). Ein ähnliches Phänomen konnte bei der Interaktion der regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2 mit dem „Fibroblast Growth Factor-2“ (FGF-2) beobachtet werden. Nach einer Bindung dieser beiden Proteine wurde die Kinaseaktivität der CK2 gesteigert (Bonnet *et al.*, 1996). Auch Interaktionsversuche der  $\beta$ -Untereinheit mit anderen Proteinkinasen wie z.B. A-Raf oder c-mos haben gezeigt, dass auch hier eine Bindung mit der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase CK2 zu einer Modulation der Aktivität dieser beiden Kinasen führt (Chen *et al.*, 1997; Boldyreff & Issinger, 1997; Hagemann *et al.*, 1997).

Eine Untersuchung von spezifischen Bindungspartnern für die katalytischen Untereinheiten gestaltet sich auf Grund der hohen Homologie zwischen den beiden Proteinen schwer. So konnten auch für die katalytischen  $\alpha$ - und  $\alpha'$ -Untereinheiten Interaktionspartner wie z. B. Nucleolin und das „Insulin receptor substrate 1“ (IRS-1) (Li *et al.*, 1996 & 1999), das Hitzeschockprotein Hsp 90 (Miyata & Yahara, 1992), Tubulin (Faust *et al.*, 1999) und der Spleißfaktor hPrp3p (Lehnert *et al.*, 2007) identifiziert werden. Einen spezifischen

Bindungspartner außer der Superoxid-Dismutase-1 konnte für die katalytische CK2 $\alpha$ -Untereinheit bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gefunden werden (Abramczyk *et al.*, 2003). Man muss jedoch davon ausgehen, dass weitere spezifische Interaktionspartner für die  $\alpha$ -Untereinheit existieren müssen, da man annehmen kann, dass die katalytischen Untereinheiten unterschiedliche Funktionen in der Zelle innehaben. So zeigten Phosphorylierungsuntersuchungen, dass die katalytische CK2 $\alpha$ -Untereinheit an ihrem spezifischen C-Terminus in mitotischen Zellen von p34<sup>cdc2</sup> phosphoryliert wird, die  $\alpha$ -Untereinheit jedoch nicht (Litchfield *et al.*, 1992). Diese mögliche Beteiligung der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit an der Zellteilung konnte zusätzlich durch die spezifische Interaktion mit der an der Zellteilung beteiligten Isomerase Pin 1 gezeigt werden (Messenger *et al.*, 2002). Auch für die  $\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2 ist es bereits gelungen, spezifische Interaktionspartner zu identifizieren. So beispielsweise das CK2 interacting Protein 1 (CKIP-1) (Bosc *et al.*, 2000). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion mit CKIP-1 die CK2 $\alpha$ -Untereinheit zur Plasmamembran rekrutiert (Olsten *et al.*, 2004). Eine biologische Relevanz dieser Rekrutierung ist bis dato noch ungeklärt.

Betrachtet man zusammenfassend die Untersuchungen, die Funktion und die Regulation der Proteinkinase CK2 besser zu verstehen, erkennt man, dass ein wichtiger Aspekt dabei Protein-Interaktionen darstellen. Sei es, dass die Modulation der Kinaseaktivität die CK2 selbst oder andere Kinasen betrifft oder dass eine Interaktion zu einer Translokation von Proteinen führt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen daher mit Hilfe von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen neue Interaktionspartner für die Proteinkinase CK2 identifiziert und charakterisiert werden, die im optimalen Fall spezifisch nur mit einer der beiden CK2-Untereinheiten interagieren. Man erhofft sich auf diese Weise, die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Untereinheiten besser verstehen zu können.

## 4. Material

### 4.1 Chemikalien und Materialien

Chemikalien (Reinheitsgrad p. A.) :	Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Fischar (Saarbrücken)
15 ml/50 ml Reaktionsgefäße	Greiner, Nürtingen
6-Kavität-Platten	Greiner, Nürtingen
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agfa Cronex 5 Röntgenfilme	Mortsel, Belgien
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco, Hamburg
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, München
Casein Kinase II Inhibitor (TBB)	Calbiochem, Darmstadt
Complete <sup>TM</sup> -Proteaseinhibitor	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Boehringer, Ingelheim
Dialyseschlauch	Boehringer, Mannheim
Dithiothreitol	Sigma, München
DMEM-Medium	Sigma, München
DMEM HAM's F12-Medium	Promocell, Heidelberg
DMSO	Merck, Darmstadt
ECL-Detektlösung	Amersham Pharmacia, Freiburg
Effectene <sup>TM</sup>	Qiagen, Hilden
EDTA	Sigma, München
EGTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Boehringer, Ingelheim
Filterpapier 3MM	Whatman, England
Fetales Kälberserum	Gibco BRL, München
Generuler <sup>TM</sup> DNA 1kb Ladder	MBI Fermentas, Heidelberg
Glutathion	Sigma, München

Glutathionsepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Hefemedien	Clontech, Heidelberg
HEPES	Sigma, München
IPTG	Sigma, München
LB-Medium	Sigma, München
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
MES	Serva, Heidelberg
Mounting Medium	Vector Labs, USA
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	Qiagen, Heidelberg
Nonidet P40	Fluka, Neu-Ulm
P81 Kationentauscher Filterpapier	Whatman, England
Protein A-Sepharose CL4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
Protein-Molekulargewichtsstandard	MBI Fermentas, Heidelberg
PVDF-Membran	Roche Diagnostics, Mannheim
Sf9-Insektenzellmedium	PAA, Österreich
TEMED	Serva, München
Triton X-100	Serva, München
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm

## 4.2 Radiochemikalien

<sup>32</sup> P-γ-ATP	ICN, Eschwege
<sup>33</sup> P-Phosphorsäure	ICN, Eschwege

## 4.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	MBI Fermentas, Heidelberg
Pwo-DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, Heidelberg
Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
RNase A	Sigma, München
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, Heidelberg

#### 4.4 Geräte

Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman, München
Bildanalysesystem Axio Vision 2.0	Zeiss, Oberkochen
Brutschrank 6030 für Bakterien	Heraeus, Hanau
Brutschrank 6220 mit CO <sub>2</sub> -Begasung	Heraeus, Hanau
Digitalkamera AVT Horn 3CCD	Zeiss, Oberkochen
Eppendorf 5414C Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
190S AB7LA Szintillationsanalyzer	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Röntgenfilmentwicklermaschine	AGFA-Gaevert, Belgien
Sigma 4K10 Kühlzentrifuge	Sigma, München
Ultraspec 2100pro Einstrahlphotometer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ultrazentrifuge L-60	Beckman, München
Sonifier Cell Disruptor B 15	Branson, USA
Ultraschallbad Transsonic 460	Elma, Singen

#### 4.5 Gebrauchsfertige Reaktionskits

Baculogold <sup>TM</sup> Transfection Kit	BD Biosciences, San Diego
EZNA Plasmid Mini Kit	Omega Bio-teck, USA
Nucleobond <sup>®</sup> AX-Plasmid-Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren
QuickChange <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
PeqGold Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
TNT T7 coupled reticulocyte lysate system	Promega GmbH, Mannheim

#### 4.6 Nährmedien für Bakterien

LB (Luria-Bertani) Medium und Platten: 1% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH einstellen auf 7.0. Für die Platten werden 2% Agar (w/v) auf 1 Liter LB-Flüssigmedium gegeben und anschließend autoklaviert. Bei Transformation mit Vektoren mit Ampicillin-, Tetracyclin- oder Kanamycinresistenz wird das entsprechende Antibiotikum in einer Endkonzentration von 50 µg/ml, 12.5 µg/ml oder 25 µg/ml eingesetzt.



#### **4.7 Nährmedien für Hefen**

Nicht transformierte Hefen werden in YPD-Flüssigmedium (Clontech, Heidelberg) oder auf YPD-Platten (2% (w/v) Agar in YPD-Flüssigmedium) kultiviert. Transformierte Hefen werden in Single-Dropout-Flüssigmedium (SD-Medium) oder auf SD-Platten (2% (w/v) Agar in SD-Flüssigmedium) kultiviert. Für die Selektion auf Auxotrophie wird das SD-Medium mit Aminosäuren supplementiert. Zum Nachweis der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität wird pro Liter SD-Agar 1 ml einer  $\alpha$ -X-Gal-Lösung (20 mg/ml in Dimethylformamid) hinzugegeben und daraus die Kulturplatten gegossen.

#### **4.8 Molekulargewichtsmarker**

##### **4.8.1 DNA-Molekulargewichtsmarker**

Zur Bestimmung doppelsträngiger DNA-Fragmente wird die GeneRuler™ 1kb DNA Ladder von MBI Fermentas verwendet, die geeignet für die Differenzierung der Größen von 0.25 bis 10 kb ist. Die Leiter setzt sich zusammen aus 14 diskreten Fragmenten der Größen (in bp) von: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250. Für die Gelanalyse werden 2 bis 5  $\mu$ l dieses Markers mit einer Konzentration von 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l eingesetzt.

##### **4.8.2 Protein-Molekulargewichtsmarker**

Zur Größenbestimmung der Molekülmasse von Proteinen im Westernblot wird der Prestained Protein Molecular Weight Marker und die PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas verwendet. Der erstgenannte Proteinmarker besteht aus 6 Proteinen und reicht von einer Größe von 20 kDa bis 120 kDa, der zweite besteht aus 10 Proteinen und wird zur Detektion von Proteinen bis 170 kDa eingesetzt. Für die Massenbestimmung von Proteinen mit Coomassie-Blau Färbung wird der Unstained Protein Molecular Weight Marker von Fermentas verwendet.

## 4.9 Antikörper

### 4.9.1 Primäre Antikörper

Zur Detektion der einzelnen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 werden die von Dr. Norbert Schuster hergestellten, polyklonalen Kaninchenseren #26 (CK2 $\alpha$ ), #30 (CK2 $\alpha'$ ) und #269 (CK2 $\beta$ ) verwendet. Zusätzlich werden die von Dr. Wolfgang Nastainczyk hergestellten, monoklonalen Mausantikörper in affinitätsgereinigter Form gegen die  $\alpha$ -Untereinheit (1A5) und die  $\beta$ -Untereinheit (6D5) eingesetzt (Nastainczyk et al., 1995). Das Motorprotein KIF5C wird mit dem monoklonalen Mausantikörper H1 von Chemicon, USA (Pfister *et al.*, 1989) oder mit dem in dieser Arbeit hergestellten, polyklonalen Kaninchenserum #976 detektiert. Zur Neuronendetektion wird in der Immunfluoreszenz der monoklonale Mausantikörper NeuN (Chemicon, USA) verwendet. Bakterielle oder eukaryotische Proteinexpression wird mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen GFP (Dianova, Hamburg) überprüft.

### 4.9.2 Sekundäre Antikörper

Für Westernblot Analysen mit monoklonalen Mausantikörpern wird ein Ziege-Anti-Maus-Ig-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper, für die Analyse mit polyklonalen Kaninchenseren ein Ziege-Anti-Kaninchen-Ig-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper der Firma Dianova, Hamburg verwendet. Die in dieser Arbeit gebräuchlichen Verdünnung sind: 1:10000 und 1:30000.

In der Immunfluoreszenz werden Sekundärantikörper verwendet, die an einen ALEXA-Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt sind. Im Allgemeinen werden für monoklonale Mausantikörper ein Ziege-Anti-Maus-Ig-ALEXA 488-Antikörper, für polyklonale Kaninchenseren ein Ziege-Anti-Kaninchen-Ig-ALEXA 594-Antikörper (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet.

### 4.10 Bakterienstämme

*Escherichia coli* XL1 blue: (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacqZ  $\Delta$  M15 Tn10 (Tetr)]). Diese Bakterien werden zur Klonierung, Plasmidamplifikation und Plasmidaufreinigung verwendet. Bakterien dieses Stammes besitzen eine eigene Tetracyclinresistenz.

*Escherichia coli DH5α*: ( F' [Phi] Δ M15 Δ [lacZYA-argF] U169 endA1 recA1 hsdR17[r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>] deoR thi-1 supE44 λ<sup>-</sup> gyrA96 relA1). Bakterien dieses Stammes werden auch zur Klonierung, Plasmidamplifikation und –aufreinigung verwendet. Da diese Bakterien nicht zur CpG-Methylierung in der Lage sind, eignen sie sich zur Amplifikation von Plasmiden, die mit Restriktionsenzymen inkubiert werden, welche durch methylierte Basen inhibiert werden (z.B.: NotI).

*Escherichia coli BL21(DE3)*: (hsdS gal[lclts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1]). Dieser Bakterienstamm wird zur T7-Promotor abhängigen Expression rekombinanter Proteine verwendet.

#### 4.11 Hefestamm

*Saccharomyces cerevisiae AH109*: (MATa, ura-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met, gal80Δ, URA3, GAL1<sub>uas</sub>, -GAL<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, ura: MEL<sub>UAS</sub>-MEL<sub>TATA</sub>-lacZ)

#### 4.12 Primer

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Schnittstelle
KIF5C MD for	AGAGAGGAATTCATGGCGGATTCCAGCCGA	<i>EcoRI</i>
KIF5C MD rev	AGAGAGGAATTCTAGGTTACAGAGACTGTAT	<i>EcoRI</i>
KIF5C NMD for	AGAGAGGAATTCGAACTGACAGCAGAAGAA	<i>EcoRI</i>
KIF5C NMD rev	AGAGAGGAATTCTTTCTGGTAGTGAGTGGA	<i>EcoRI</i>
KIF5C VL for	AGAGAGGAGCTCGCGGATCCAGCCGAATGCAG	<i>SacI</i>
KIF5C VL rev	AGAGAGGTCGACTTTCTGGTAGTGAGTGGAATT	<i>SalI</i>
CK2α for	AGAGAGGGTACCTCGGGACCCGTCCCAAG	<i>KpnI</i>
CK2α rev	AGAGAGGGATCCTCTAGACTGCTGAGCGCCAGC GGC	<i>BamHI/XbaI</i>
CK2α' for	AGAGAGGGTACCCCCGGCCCGGCCGCG	<i>KpnI</i>
CK2α' rev	AGAGAGTCTAGATCATCGTGCTGCCGTGAG	<i>XbaI</i>
KIF5C T338A for	ACCTAGAACTGGCAGCAGGAATGGAAG	-
KIF5C T338A rev	TTCTTCTGCTGCCAGTTCTAGGTTACAGA	-
KIF5C T338D for	AACCTAGAACTGGACGCAGGAATGGAAG	-
KIF5C T338D rev	TTCTTCTGCGTCCAGTTCTAGGTTACAGA	-

### 4.13 Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pGBKT7-CK2 $\alpha$	DNA-BD-CK2 $\alpha$ -Fusionsprotein für 2-Hybrid	Kaul, 2003
pGBKT7-CK2 $\alpha'$	DNA-BD-CK2 $\alpha'$ -Fusionsprotein für 2-Hybrid	Lehnert <i>et al.</i> , 2007
pBlueskript SK(+) KIAA 0531	Volllängen DNA von KIF5C	Prof. T. Nagase Kazusa Research Institute, Chiba, Japan
pT7-7-CK2 $\alpha$	Bakterielle Expression der humanen CK2 $\alpha$ -Untereinheit	Grankowski <i>et al.</i> , 1991
pT7-7-CK2 $\alpha'$	Bakterielle Expression der humanen CK2 $\alpha'$ -Untereinheit	Grankowski <i>et al.</i> , 1991
pEYFP-KIF5C MD (1-335)	FRET-Konstrukt der Motordomäne von KIF5C	Smith <i>et al.</i> , 2006
pEYFP-KIF5C NMD (336-957)	FRET-Konstrukt der Nicht-Motordomäne von KIF5C	Smith <i>et al.</i> , 2006

### 4.14 Puffer und Lösungen

ATPase Puffer

40 mM HEPES/KOH, pH 7.4  
25 mM KCl  
2.5 mM MgCl<sub>2</sub>

Kinasepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.5  
100 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT

CK2-Reaktionsmix

41.6 mM Tris-HCl, pH 8.5  
250 mM NaCl  
8.4 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 mM DTT

	84 mM	ATP
	0.32 mM	synthetisches Peptid
Coomassie-Blau Färbelösung	0.2%	Coomassie R250
	0.01%	Coomassie G250
	50%	Methanol
	10%	Essigsäure
Cytoplasma Extraktionspuffer	10 mM	MES, pH 6.2
	10 mM	NaCl
	1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10%	Glycerin
	1 mM	EGTA
	5 mM	DTT
	1%	NP 40
DEAE-Dextran	50 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	50 mg/ml	DEAE-Dextran
Elektrophoresepuffer	250 mM	Tris-HCl, pH 8.8
	1.92 M	Glycin
	35 mM	SDS
Entfärbelösung	10%	Eisessig
	20%	Methanol
	70%	Wasser
Extraktionspuffer (His-Reinigung)	20 mM	NaCl
	0.5 mM	DTT
	in 20 mM	Phosphatpuffer, pH 8.0
Fixier-Lösung	30%	Methanol
	10%	Eisessig
	60%	Wasser

---

HBS (2x)	280 mM NaCl 50 mM HEPES 1.5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.12
His-Lysepuffer	6 M Guanidin-Hydrochlorid 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 8.0
Modifizierter Ripa-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.4 150 mM NaCl 1% NP 40 0.25% Na-desoxycholat
P1 Resuspendierpuffer für Bakterien	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/ml DNase freie RNase A
P2 Lysepuffer für Bakterien	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
P3 Neutralisationspuffer für Bakterien	3 M K-Acetat, pH 5.5
PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4
Phosphat-Markierungsmedium	32 g NaCl 2 g KCl 1.32 g CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 5 g D-Glucose 0.5 mg Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9 H <sub>2</sub> O 18.5 g NaHCO <sub>3</sub> 420 mg L-Arginin-HCl

---

---

	240 mg L-Cystein
	2.9 g L-Glutamin
	210 mg L-Histidin-HCl x H <sub>2</sub> O
	730 mg L-Lysin-HCl
	30 mg L-Methionin
	330 mg L-Phenylalanin
	475 mg L-Threonin
	80 mg L-Tryptophan
	360 mg L-Tyrosin
	470 mg L-Valin
	210 mg L-Serin
	525 mg L-Leucin
	150 mg Glycin
	ad 5 l H <sub>2</sub> O, pH 7.35
Phosphatpuffer	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8.0
Puffer A	10 mM HEPES, pH 7.3
	0.5 mM EGTA
	0.5 mM MgCl <sub>2</sub>
	50 µM ATP
Puffer R1	100 mM Tris-HCl, pH 7.8
	100 mM NaCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	0.1% Tween 20
Ripa-Puffer	50 mM Tris, pH 8.0
	150 mM NaCl
	0.5% Na-desoxycholat
	1% Triton X-100
	0.1% SDS

---

---

2x SDS- Probenpuffer	120 mM Tris-HCl, pH 6.8 4% (w/v) SDS 200 mM DTT 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 20% (v/v) Glycerin 0.02% Bromphenolblau
TAE-Ladepuffer	20% Glycerin 80% 2x TAE-Puffer Bromphenolblau Xylencyanol
TAE-Puffer	400 mM Tris-Acetat, pH 7.2 10 mM EDTA 200 mM Na-Acetat
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 2 mM EDTA
TfBI	30 mM K-Acetat 50 mM $MnCl_2$ 100 mM KCl 10 mM $CaCl_2$ 15% (v/v) Glycerin
TfBII	10 mM Na-Mops, pH 7.0 75 mM $CaCl_2$ 10 mM KCl 15% (v/v) Glycerin
TMK <sub>100</sub>	20 mM Tris-HCl, pH 8.0 100 mM NaCl 10 mM $MgCl_2$

---



---

TMK <sub>300</sub>	20 mM Tris-HCl, pH 8.0 300 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>
TPM-Medium	20 g Trypton 15 g Hefeextrakt 8 g NaCl 2 g Glucose 2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O
Transferpuffer:	20 mM Tris-HCl, pH 8.3 150 mM Glycin
TYM-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O
Waschpuffer	0.1% (v/v) Tween20 in PBS

#### 4.15 Computersoftware

Tabellen wurden mit Microsoft Excel für WindowsXP erstellt. Für die schriftliche Ausarbeitung der Arbeit kam Microsoft Word 2000 zur Anwendung. Für die Darstellung von Schaubildern und Graphiken wurden Microsoft Powerpoint und Adobe Photoshop herangezogen. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mittels der Internet-basierten Sequenzdatenbank "BLASTN" (= Standard nucleotide-nucleotide BLAST / BLAST = Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) am NCBI (= National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health (NIH), USA) bzw. bei GenomeNet (= Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan) auf Übereinstimmungen geprüft. Die Bestimmung der aus der DNA-Sequenz resultierenden Aminosäure-Sequenz der Proteine erfolgte mittels ExPASy-"Translate" (DNA zu Protein) (ExPASy = Expert Protein Analysis System) des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). Zur

densitometrischen Erfassung der ATPase Assays und *in vitro* Phosphorylierungen wurde das Programm ImageQuant 5.1 verwendet. Das online verfügbare Programm Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) half auf der Suche nach internen Schnittstellen innerhalb der KIF5C- und CK2-DNA-Sequenz. Die Auswertung der statischen FRET-Messungen erfolgte mit Hilfe des im Internet erhältlichen Programmes ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## 5. Methoden

### 5.1 DNA-Techniken

#### 5.1.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion ( PCR )

Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis *et al.*, 1987) können DNA-Abschnitte gezielt modifiziert und selektiv amplifiziert werden. Zur Vervielfältigung der DNA verwendet man zwei Matrizen-DNA flankierende Oligonukleotide (Primer), eine temperaturstabile DNA-Polymerase und Desoxyribonukleotid-Triphosphate. Die PCR besteht aus 25 - 30 Reaktionszyklen, bei der jeder Zyklus aus drei Reaktionsphasen besteht: einer Denaturierungsphase der DNA bei 94°C, einer „Annealing-Phase“, in der die Primer mit der komplementären Sequenz der Matrize hybridisieren und einer Elongations-Phase, in der der Gegenstrang der Matrize synthetisiert wird. Wird das Amplifikat für eine Klonierung weiterverwendet, sollte eine Polymerase mit Korrekturlese-Funktion (z.B. Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*) gewählt werden. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation eines Amplifikats durch eine Kolonie-PCR kann eine DNA-Polymerase ohne diese Korrekturlese-Funktion gewählt werden, z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Nach Beendigung der PCR können die hergestellten DNA-Fragmente weiterverwendet werden.

#### 5.1.2 Mutagenisierung von DNA

Bei einer Mutagenisierung wird DNA durch die künstliche Veränderung von einzelnen oder mehreren Basen in einer Polymerase-Ketten-Reaktion individuell verändert. Die Primer werden so konstruiert, dass diejenige Stelle, die im Folgenden mutagenisiert werden soll, in der Mitte des Primers liegt. Damit soll das mögliche Aufschmelzen der instabileren Heteroduplex verhindert werden, die sich durch die Primeranlagerung in der „Annealing-Phase“ bildet. Für das Design der Primer ist eine Schmelztemperatur von mehr als 78°C und ein GC-Gehalt von mehr als 40% vorgeschrieben. Es ist empfehlenswert, die gewünschte Mutation mit 10 - 15 Basen einzurahmen. Nach Ablauf der PCR wird das Amplifikat mit der Restriktionsendonuklease DpnI inkubiert, welche spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet. Da die Matrize in methylierter Form vorliegt, wird durch 1-stündige

Inkubation mit 10 U DpnI nur die Ausgangs-DNA verdaut und das Amplifikat bleibt zurück. Es kann für weitere Untersuchungen verwendet werden. Die Mutagenisierungs-Reaktionen wurden mittels des „QuickChange® site-directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **5.1.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um bakterielle Enzyme, die kurze DNA-Abschnitte erkennen und diese durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen spezifisch spalten. Eine Restriktion wird im Allgemeinen mit 1 - 3 µg der zu schneidenden DNA durchgeführt. Der Restriktionsansatz enthält neben der DNA noch die spezifische Endonuklease und den für die Endonuklease geeigneten Puffer. Die Dauer einer Restriktion liegt zwischen 90 Minuten und drei Stunden.

### **5.1.4 Horizontale DNA-Agarosegelelektrophorese**

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund unterschiedlicher Molekülgröße aufgetrennt. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten von einer Größe bis zu 10 kb werden 1%ige Agarosegele verwendet. Dazu kocht man 150 ml 1 x TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose (w/v) im Mikrowellenherd, um die Lösung anschließend auf eine Temperatur zwischen 50 - 60°C abzukühlen. Bei dieser Temperatur erfolgt die Zugabe von 15 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) und das Eingießen in eine Gel-Kammer mit Taschenkamm. Nach dem Auspolymerisieren wird das Gel in eine horizontale Gel-Kammer überführt und mit TAE-Puffer geflutet. Das Auftragen der Proben geschieht an der Kathodenseite zusammen mit 5 - 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers um anschließend die Proben bei einer Spannung von 70 - 80 V aufzutrennen. Das so erhaltene Bandenmuster wird auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht.

### **5.1.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolation von DNA aus Agarosegelen wird mit dem peqGold Gel Extraction Kit der Firma Peqlab, Erlangen durchgeführt. Hierbei wird die geschmolzene DNA-Lösung an eine Glasfibrermatrix gebunden und anschließend eluiert. Die genaue Durchführung kann dem Protokoll der Firma entnommen werden.

### 5.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wird an einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei  $\lambda = 260$  nm entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA bzw. 30  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Der Reinheitsgrad einer DNA-Lösung wird über den Quotienten  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  bestimmt. Ein Wert zwischen 1.65 und 1.85 spricht für einen hohen Reinheitsgrad, bei Quotienten kleiner als 1.65 ist die DNA mit Proteinen verunreinigt, Quotienten größer als 1.85 lassen auf phenolische Rückstände schließen.

### 5.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation handelt es sich um die Verknüpfung von passenden DNA-Fragmenten mit Hilfe des Enzyms T4-Ligase. Die Ligation der Fragmente ist ATP-abhängig und erfolgt über die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen. Eine Ligation erfolgt über Nacht bei 16°C mit 3 - 4 fachem Überschuss von Insert-DNA zu Vektor-DNA mit 10 U Enzym im Ligasepuffer.

### 5.1.8 Erzeugung von chemisch kompetenten Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurde nach dem Protokoll von Hanahan, 1983 durchgeführt. Dazu inkubiert man 50  $\mu\text{l}$  Bakterien in 20 ml TYM-Medium bei 37°C bis eine optische Dichte  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$  erreicht ist. Man verdünnt die Bakterienkultur auf 100 ml bis zum erneuten Erreichen der oben genannten OD, um die 100 ml-Kultur abschließend auf 500 ml zu verdünnen. Beim Erreichen einer  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$  wird die Bakterienkultur durch Schütteln in einen NaCl-Eiswasserbad rasch abgekühlt und dann bei 4000xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Man resuspendiert das Bakterienpellet in 100 ml eiskaltem TfbI-Puffer und zentrifugiert erneut. Das Pellet wird in 20 ml kaltem TfbII-Puffer aufgenommen, in 200  $\mu\text{l}$  Schritten in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der kompetenten Bakterien erfolgt bei -80°C.

### 5.1.9 Erzeugung von elektrokompetenten Bakterien

Eine 50 ml Bakterienvorkultur wird mit 100 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer optischen Dichte  $OD_{600\text{ nm}} = 0.5 - 1$  kultiviert. Es folgt eine rasche Abkühlung in einem Eiswasserbad und eine 10-minütige Zentrifugation bei 4000xg und 4°C. Das Bakterienpellet wird zweimal mit 500 ml kaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Abschließend nimmt man das Pellet in 3 ml 10% Glycerin auf, aliquotiert die Bakterien in 100 µl Schritten und schockgefriert sie in flüssigem Stickstoff. Eine Aufbewahrung erfolgt bei -80°C.

### 5.1.10 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Um Fremd-DNA in Bakterien einzubringen wird die Hitzeschockmethode von Lederberg & Cohen (1974) verwendet. Hierzu werden 100 µl kompetente Bakterien zu 200 ng der gewünschten DNA gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden und nach anschließender Zugabe von 800 µl LB-Medium eine einstündige Vorkultur. Schließlich werden die transformierten Bakterien auf LB-Agar Platten mit dem geeigneten Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C bebrütet oder direkt in Flüssigmedium mit Antibiotikazusatz angeimpft.

### 5.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Eine 3 ml Übernachtskultur von *E. coli* wird bei 5000xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 150 µl P1-Puffer (50 mM, Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml DNase freie RNase A) resuspendiert und die Bakterien anschließend durch Zugabe von 150 µl P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) und leichtem Invertieren lysiert. Bei Klärung des Lysats werden 150 µl P3-Puffer (3 M K-Acetat, pH 5.5) hinzugefügt und die ausgefällten Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000xg sedimentiert. Der klare Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 0.7 fachen Volumen an Isopropanol versetzt. Es folgt ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 10°C und 13000xg, um die gelöste DNA zu fällen. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet wird 10 Minuten bei 4°C und 13000xg mit 100% Ethanol gewaschen. Nach vorsichtiger Abnahme des Ethanols wird das Pellet getrocknet und dann in 20 µl

bidestilliertem Wasser gelöst. Zusätzlich wurden für Plasmidpräparationen der „EZNA Plasmid Mini Kit“ der Firma Omega Bio-teck, USA verwendet. Diese Methode wird jedoch nur bei Proben verwendet, die im Anschluss sequenziert werden, da diese Art der Isolierung eine bessere Reinheit der DNA gewährleistet. Die praktische Durchführung der DNA-Isolation kann der Gebrauchsanweisung des Kits entnommen werden. Bei DNA-Isolationen aus Bakterienkulturen bis 100 ml wird der „Nucleobond® AX-Plasmid-Purification Kit“ von Macherey-Nagel, Düren verwendet. Die Isolation verläuft prinzipiell wie die Aufreinigung im kleinen Maßstab, nur dass die zu reinigende DNA an eine Säule gekoppelt und im Anschluss von dieser Säule eluiert wird. Die genaue Durchführung dieser DNA-Isolations-Methode kann den Angaben des Herstellers entnommen werden.

#### **5.1.12 *In vitro* Translation**

Die *in vitro* Translation kann verwendet werden, um ausreichende Proteinmengen schnell herzustellen, die unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Hierzu wurde das „T7-TNT coupled reticulocyte lysate“-System von Promega, Mannheim verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

## **5.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden**

### **5.2.1 Zelllinien**

#### **SH-SY5Y (ATCC Nr.: CRL-2266)**

Hierbei handelt es sich um eine adhärente Subzelllinie der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH, welche 1970 aus einem metastasierenden Knochentumor eines vierjährigen Mädchens etabliert wurde. SH-SY5Y Zellen gelten als Model für die neuronale Differenzierung, da sie sich durch Zugabe von Retinsäure oder durch Serumentzug zu neuronartigen Zellen differenzieren lassen (König *et al.*, 1990).

#### **NSC-34**

Bei der Zelllinie NSC-34 (Cashman *et al.*, 1992) handelt es sich um eine immortalisierte Neuroblastomzelllinie, die mit Rückenmarkszellen hybridisiert wurde, welche eine Vielzahl

von Motorneuronen enthalten. Diese Zelllinie zeigt zusätzliche Eigenschaften, welche man auch bei Motorneuronen erwarten würde, wie z.B. die Generation von Aktionspotentialen und die Acetylcholinsynthese, -speicherung und -freisetzung.

#### **COS-1 (ATCC-Nr.: CRL-1650)**

Bei COS-1 handelt es sich um eine etablierte Nierenzelllinie der grünen Meerkatze, die mit dem SV40 T-Antigen transformiert wurden. Diese Zellen sind für eine Überexpression von Proteinen geeignet, deren DNA in einen Vektor inkloniert wurde, welcher der T-Antigen abhängigen DNA-Replikation und Transkription unterliegt.

#### **HEK-293 (ATCC-Nr.CRL-1573)**

Diese hypotriploide, adhärent wachsende Zelllinie wurde durch Transformation von menschlichen embryonalen Nierenzellen mit der Adenovirus 5 DNA etabliert. HEK-293 Zellen eignen sich für eine Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode.

### **5.2.2 Zellkulturbedingungen**

Alle verwendeten Säugerzellen werden in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Gewebekulturflaschen oder -schalen kultiviert. Alle Zellen mit Ausnahme der SH-SY5Y Zellen werden in DMEM Medium kultiviert, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 2 mM Glutamin. SH-SY5Y werden in DMEM HAM'S F12 mit 10% FCS und 2 mM Glutamin kultiviert. Eine Kultivierung erfolgt bis zur Subkonfluenz der Zellen, um sie anschließend mit Hilfe einer Trypsin/EDTA Lösung (0.25% Trypsin, 0.1% EDTA in PBS) abzulösen und auf neue Kulturschalen auszusäen.

### **5.2.3 Einfrieren von Säugerzellen**

Zur Aufbewahrung von Säugerzellen über einen längeren Zeitraum, können sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierzu werden die Zellen vom Schalenboden abtrypsiniert, in DMEM resuspendiert und bei 400xg für 7 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wird in eiskaltem DMEM mit 40% FCS resuspendiert. Unter ständigem Schütteln auf Eis wird DMEM mit 20% DMSO tropfenweise hinzugefügt. Die Zellen werden in gekühlte Kryoröhrchen überführt und anschließend in der Gasphase über flüssigem Stickstoff



inkubiert. Nach 2 Stunden können die Zellen in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt und über Monate gelagert werden.

#### **5.2.4 Auftauen von Säugerzellen**

Zum Auftauen von Zellen transportiert man sie auf Stickstoff und lässt sie bei 37°C möglichst schnell auftauen. Es wird nun schrittweise das 10-fache Volumen an kaltem DMEM mit 10% FCS hinzugefügt. Anschließend werden die Zellen bei 4°C und 400xg für 7 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird in frischem Medium resuspendiert, in Kulturschalen überführt und im Brutschrank inkubiert.

#### **5.2.5 Beseitigung von Kontaminationen**

Kontaminationen sollten nur dann beseitigt werden, wenn es sich um eine unersetzliche Zelllinie handelt. Ansonsten sollte man die Zellen aus dem Brutschrank entfernen und autoklavieren, um so eine Ausbreitung der Kontamination auf andere Zellen zu verhindern. Es sollte auch darauf verzichtet werden, Zellen prophylaktisch unter Antibiotikazusatz zu kultivieren, um eine Resistenzbildung bei Bakterien oder Hefen zu vermeiden. Bei bakteriellen Kontaminationen werden die Zellen mehrmals mit Kulturmedium gewaschen und dann mit einer 1:100 fachen Verdünnung einer Penicillin/Streptomycin (10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin Biochrom, Berlin) Lösung im Nährmedium für mehrere Tage behandelt. Bei Kontaminationen mit Hefen erfolgt nach mehrmaligem Waschen mit Kulturmedium die Zugabe von Amphotericin B (250 µg/ml, Biochrom, Berlin) in einer 1:100-fachen Verdünnung pro ml Nährmedium.

#### **5.2.6 Transfektion von HEK-239 Zellen mit der Calciumphosphat-Methode**

Man macht sich bei dieser Methode die Fähigkeit von HEK-293 zu Nutze, Calciumphosphatkristalle zu phagocytieren; copräzipitierte Plasmid-DNA kann so in die Zellen eingebracht werden. HEK-293 Zellen werden am Vortag auf Deckgläser oder Schalen ausgesät und über Nacht kultiviert, um ein Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Am Folgetag wäscht man die Zellen zweimal mit DMEM-Medium ohne FCS und inkubiert die Zellen in diesem Medium. Für eine Transfektion wird ein Ansatz aus 5 µg DNA/Kulturschale

und 11 µl CaCl<sub>2</sub> hergestellt, welcher mit bidestilliertem Wasser zu einem Endvolumen von 100 µl aufgefüllt wird. Zu diesem Ansatz werden 110 µl einer 2x HBS-Lösung gegeben und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das DNA-Gemisch zu den Zellen hinzugegeben und die Zellen für weitere 4 - 6 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend entfernt man das Medium, spült die Zellen erneut und kultiviert sie in DMEM-Medium mit 10% FCS für 24 bis 48 Stunden, um danach die Proteinexpression zu kontrollieren.

### **5.2.7 Transfektion von COS-1 Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode**

Bei der DEAE-Dextran-Transfektion handelt es sich um eine standardisierte, effiziente und kostengünstige Methode DNA in COS-1 Zellen einzubringen. Hierzu werden COS-1 Zellen am Vortag auf Deckgläser oder Schalen ausgesät und über Nacht kultiviert. Am Folgetag wäscht man die Zellen zweimal mit DMEM-Medium, um das ursprüngliche Kultivierungsmedium so gut wie möglich zu entfernen. Es folgt die Zugabe von 4 ml DMEM-Medium pro Schale, 10 µg der zu transfizierenden DNA sowie 20 µl der DEAE-Dextran-Lösung (25 mg/ml). Die Zellen werden für 4 Stunden weiterkultiviert, um so die Anlagerung der DNA-DEAE-Dextran-Komplexe an die Zellen zu gewährleisten. Danach entfernt man das Medium von den Zellen und inkubiert sie für 2 Minuten mit der Transfektionslösung (50% HBS, 40% destilliertes Wasser, 10% DMSO). Bei diesem Schritt wird die Zellmembran permeabilisiert und die DNA-Komplexe können in das Zellinnere eindringen. Die Transfektionslösung wird entfernt und die Zellen erneut zweimal mit DMEM-Medium gewaschen, um sie dann in DMEM-Medium mit 10% FCS weiterzukultivieren. Eine Proteinexpression kann 24 bis 48 Stunden später kontrolliert werden.

### **5.2.8 Radioaktive *in vivo* Markierung von Proteinen**

Zur Analyse von Phosphoproteinen in der lebenden Zelle erfolgt eine radioaktive Phosphatmarkierung mit <sup>33</sup>P-Ortho-Phosphorsäure. Hierzu werden 70% konfluente Zellen dreimal mit Phosphatmarkierungs-Medium gewaschen und 30 Minuten darin vorinkubiert, um möglichst alles verbliebene Phosphat in der Zelle zu verbrauchen. Im Anschluss werden 100 µCi <sup>33</sup>P-Phosphorsäure pro ml Medium zu den Zellen hinzugegeben und 2 Stunden bei 37°C kultiviert. Nach Ablauf von 2 Stunden werden die Zellen dreimal mit kaltem PBS

gewaschen, durch Abschaben geerntet und lysiert. Die Lysate können nun für Folgeexperimente eingesetzt werden.

### **5.2.9 Kultivierung von hippocampalen Neuronen**

Die Kultivierung von hippocampalen Neuronen erfolgte in Neurobasal A Medium supplementiert mit 2% B27, 1% Glutamax-Stock und 0.2% Penicillin-/Streptomycin-Mix (Invitrogen, Karlsruhe) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer wassergesättigten Atmosphäre.

### **5.2.10 Präparation von Astrocyten**

Die Präparation von Astrocyten ist der vorbereitende Schritt zur eigentlichen Präparation von Neuronen, da Neurone auf zuvor kultivierten Astrocyten ausgesät wurden. Dazu wird einer neugeborenen bis einen Tag alten Maus der Kopf mit 70% Ethanol desinfiziert, bevor er durch einen Schnitt vom Körper getrennt wird. Man entfernt die Haut und den Schädel, um den Cortex zu entnehmen. Aus dem Cortex präpariert man den Hippocampus, welcher im Anschluss durch ein Sieb in ein Reaktionsgefäß mit 40 ml DMEM-Medium ohne FCS überführt wird. Nach einem 7-minütigen Zentrifugationsschritt bei 350xg wird der Überstand entfernt, das Pellet in 1 ml DMEM resuspendiert und die Zellen gezählt. Abschließend werden die Zellen in Collagen-beschichteten Flaschen mit 10% FCS-DMEM-Medium mit 0.2% Penicillin-Streptomycin-Mix und 0.1% MITO (Invitrogen, Karlsruhe) bei 37°C und 9% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **5.2.11 Präparation von hippocampalen Neuronen**

Bei der Präparation von hippocampalen Neuronen wird der Hippocampus nach Extraktion in 1 ml Enzymlösung (DMEM-Medium mit 2 mg Cystein, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 250 U Papain) überführt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Absaugen der Enzymlösung wird der Hippocampus in 1 ml Inaktivierungslösung (10 ml 10% FCS-DMEM-Medium, 25 mg Albumin, 25 mg Trypsin-Inhibitor) aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach entfernt man die Lösung und gibt in 5 Schritten zu je 200 µl das FCS-DMEM-Medium hinzu. Dazwischen wird die Lösung mehrmals durch Pipettieren resuspendiert. Beim Erreichen von 1 ml hippocampaler Zelllösung werden die Neurone

ausgezählt und auf die Astrocytenkultur ausgesät, bei der zuvor das FCS-DMEM-Medium durch Neurobasal A-Medium ersetzt wurde.

### 5.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden

#### 5.3.1 Induktion der Proteinexpression in *E. coli*

Eine über Nacht bei 37°C angewachsene Bakterienkultur wird am folgenden Tag mit LB-Medium auf 1 Liter verdünnt und bis zu einer optischen Dichte  $OD_{600nm} = 0.5 - 1.0$  kultiviert. Beim Erreichen dieser optischen Dichte wird die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM gestartet. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C können die Bakterien nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 5000xg sedimentiert und bis zur Proteinreinigung bei -20°C gelagert werden. Um eine erfolgreiche Induktion zu überprüfen, sollte man jedoch eine 1 ml Probe vor der Induktion und eine 1 ml Probe nach der dreistündigen Induktion entnehmen. Diese beiden Proben werden durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert, das Pellet in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nun kann man durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von je 10 µl der einzelnen Proben und anschließende Coomassie-Blau Färbung eine erfolgreiche Proteinexpression kontrollieren.

#### 5.3.2 Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit GSH-Sepharose

Die induzierten Bakterien werden 10 Minuten bei 4°C und 5000xg zentrifugiert, das Bakterienpellet in 25 ml Puffer R1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 0.1% Tween 20) resuspendiert und die Bakterien durch viermalige Ultraschallbehandlung für 30 Sekunden (50% Duty, Stufe 5) aufgeschlossen. Durch erneute Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit kann der nun klare Überstand mit gewaschener GSH-Sepharose bei 4°C für mindestens eine Stunde unter ständiger Bewegung inkubiert werden. Diese Suspension wird im Anschluss auf eine Säule gegeben. Die dort gesammelte Sepharose wäscht man nun mit 10 ml Puffer R1, um das Protein dann mit je 1 ml 10 mM bzw. 20 mM Glutathion in Puffer R1 von der Sepharose zu eluieren. Diese Proteinlösung wird anschließend in 2 Liter Puffer R1 dialysiert.

### 5.3.3 Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen

Die induzierten Bakterien werden 10 Minuten bei 4°C und 5000xg zentrifugiert. Das Pellet wird in 12 ml His-Lysepuffer (6 M Guanidin-Hydrochlorid, pH 8.0, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) resuspendiert und bei 4°C über Nacht lysiert. Am nächsten Tag erfolgt eine 15-minütige Zentrifugation bei 5000xg und 4°C um die Zelltrümmer vom Proteinüberstand zu trennen. Die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose wird währenddessen zweimal mit 10 ml bidestilliertem Wasser, einmal mit 5 ml  $\text{NiSO}_4$  und erneut mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Danach wird die Agarose mit Lysepuffer äquilibriert. Es folgt eine einstündige Inkubation der Agarose zusammen mit dem Proteinextrakt bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation verwirft man den Überstand und wäscht die Agarose zweimal mit His-Lysepuffer (pH 8.0) und einmal mit His-Lysepuffer (pH 6.0). Die gewaschene Agarose wird auf eine Säule transferiert und das Fusionsprotein mit His-Lysepuffer (pH 4.0) eluiert. Die Dialyse erfolgt in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 12000-19000 Dalton über Nacht gegen  $\text{TMK}_{100}$ -Puffer.

### 5.3.4 Das Baculovirus Expressionssystem

Die Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen bietet neben der Expression in Bakterien die Möglichkeit, größere Mengen eines gewünschten Proteins zu produzieren. Ein Vorteil dieses Systems ist die mögliche Erleichterung der Expression von Proteinen, welche in *E. coli* schwach bzw. nicht exprimiert werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode im Vergleich zu der Proteinexpression in Bakterien sind die posttranslationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen), die in Bakterien-Expressionssystemen nicht durchgeführt werden. Zur Expression rekombinanter Proteine wurde die Insektenzelllinie Sf9 aus *Spodoptera frugiperda* und das *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) verwendet. Das Genom des Virus kann relativ einfach so verändert werden, dass das gewünschte Protein unter der Kontrolle des viralen Polyhedrin-Promotors exprimiert wird.

### 5.3.5 Kultivierung von Sf9 Zellen

Die Kultivierung von Sf9 Insektenzellen erfolgt in fest verschraubten Kulturflaschen mit Sf9-Medium mit 10% FCS bei 28°C in einem Brutschrank ohne CO<sub>2</sub>-Begasung. Zum Passagieren werden die Zellen von den Kulturflaschen abgeklopft, 7 Minuten bei 400xg zentrifugiert, mit frischem Medium resuspendiert und auf neue Flaschen verteilt.

### 5.3.6 Infektion von Sf9 Zellen

Die Infektion von Sf9 Zellen wird mit einem Virus durchgeführt, welches eine letale Deletion aufweist, die nur durch einen komplementierenden Vektor ausgeglichen werden kann. Dieser Transfervektor wird für die Klonierung des gewünschten Genproduktes verwendet und zusammen mit dem Virus zu den Zellen hinzugegeben, um so die Expression des Proteins zu induzieren. Verwendet wurde das „Baculogold<sup>TM</sup>-System“ der Firma BD Biosciences (San Diego, USA). Die Infektion der Zellen erfolgt in Kulturflaschen nach den Angaben des Herstellers.

### 5.3.7 Vermehrung von Baculoviren

Nach der Infektion der Sf9 Zellen werden diese für 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Der Virusüberstand wird von den Zellen abgenommen und zu frischen Zellen hinzugegeben, die zuvor in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät wurden. Nach erneuter Inkubation von 5 Tagen und erneuter Virusreplikation kann der Überstand in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt werden, um ausreichende Mengen an Viren für eine Proteinexpression zu gewinnen. Nach Abschluss dieses Infektionszyklus kann der virushaltige Überstand bei 4°C als Virusstock aufbewahrt oder längerfristig durch Einfrieren mit DMSO und 20% FCS gelagert werden.

### 5.3.8 Proteinexpression in Sf9 Zellen

Zur Proteinexpression in Sf9 Zellen werden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen für drei Tage mit dem zuvor produzierten Virusstock infiziert und bei 28°C bebrütet. Nach Ablauf dieser Zeit können die Zellen durch Abklopfen aus der Flasche geerntet, durch 10-minütige

Zentrifugation bei 4°C und 2000xg vom virushaltigen Überstand getrennt und das Zellpellet für Folgeexperimente verwendet werden.

### **5.3.9 Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose unter nativen Bedingungen**

Das Insektenzellpellet wird in Extraktionspuffer (20 mM NaCl, 0.5 mM DTT in 20 mM Phosphatpuffer, pH 8.0) resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend sonifiziert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 13000xg wird der klare Überstand mit dem 0.4 fachen Volumen an KCl (1 M) und dem 0.3 fachen Volumen an Phosphatpuffer versetzt und mit gewaschener Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nach dem Überführen der Agarose auf eine Säule wird diese zweimal gewaschen (0.1% Tween-20 in TMK<sub>300</sub> und 20 mM Imidazol in TMK<sub>300</sub>) und das rekombinante Protein durch steigende Mengen von Imidazol (50 mM, 100 mM) in TMK<sub>300</sub> von der Säule eluiert. Die Dialyse der Proteine erfolgt über Nacht bei 4°C gegen TMK<sub>100</sub>.

### **5.3.10 Herstellung von Gesamtzellextrakten**

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten werden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche gelöst und 7 Minuten bei 4°C und 400xg zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in Ripa-Puffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Na-desoxycholat, 1% Triton X-100, 0.1% SDS mit Proteaseinhibitoren) resuspendiert und dreimal je 1 Minute im eisgekühlten Ultraschallbad sonifiziert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 4°C und 15000xg, um die Zelltrümmer von dem Zellextrakt zu trennen. Der so gewonnene Überstand entspricht dem Gesamtzellextrakt und kann für weitere Analysen verwendet werden.

### **5.3.11 Herstellung von Cytoplasmafraktionen aus Säugerzellen**

Zur Gewinnung einer Cytoplasmafraktion aus Säugerzellen wird zuerst das Kulturmedium der Zellen entfernt und die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen, um sie dann mit Hilfe eines Zellschabers von der Schalenoberfläche zu lösen. Die Zellen werden in ein 15 ml

Reaktionsgefäß überführt und 7 Minuten bei 4°C und 400xg zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 250 µl Cytoplasma Extraktionspuffer (10 mM MES, pH 6.2, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 1% NP 40 mit Proteaseinhibitoren) pro Schale resuspendiert und dann für 5 Minuten bei 4°C und 3000xg zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand enthält die Cytoplasmafraktion und kann für weitere Untersuchungen verwendet werden.

### **5.3.12 Herstellung von Cytoplasmafraktionen aus Maushippocampus**

Die Cytoplasmafraktion aus dem Hippocampus von Mäusen wurde nach dem im Internet erhältlichen Protokoll von Upstate ([www.upstate.com](http://www.upstate.com)) extrahiert. Man entfernt den Hippocampus von neugeborenen oder einen Tag alten Mäusen und resuspendiert sie in modifiziertem Ripa-Puffer ohne Detergentien (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl mit Proteaseinhibitoren). Anschließend erfolgen vier 30 Sekunden lange Behandlungen im Ultraschallbad mit jeweils einer Minute Pause zwischen den Beschallungsschritten. Es folgt eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 2900xg. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 45 Minuten bei 4°C und 15000xg zentrifugiert. Der nun erhaltene Überstand enthält die Cytosolfraktion und die mikrosomalen Membranen. Das Pellet dieser Zentrifugation wird in modifiziertem Ripa mit Detergentien (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP 40, 0.25% Na-desoxycholat mit Proteaseinhibitoren) aufgenommen und erneut 20 Minuten bei 4°C und 15000xg zentrifugiert. Die erhaltene Fraktion erhält die gelösten mitochondrialen und Plasmamembranproteine.

### **5.3.13 Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose**

Die Immunpräzipitation wird verwendet um Proteine oder Proteinkomplexe mit Hilfe von Antikörpern aus einem Zellextrakt oder einer Lösung zu extrahieren. Hierzu werden in 20% Ethanol gequollene Protein A-Sepharose und CL4B-Sepharose im Verhältnis 1:2 gemischt und mehrmals mit PBS gewaschen. Es werden zwei Vorpräzipitationsschritte mit je 30 µl der Sepharose und dem Proteinüberstand bei 4°C durchgeführt, um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an die Matrix binden. Während der zweiten Vorpräzipitation wird in einem separaten Ansatz der präzipitierende Antikörper mit 30 µl Sepharose mitgeführt. Der Überstand des Vorpräzipitats wird auf die zuvor mit PBS gewaschene Antikörper-inkubierte



Sepharose gegeben und mindestens 90 Minuten bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Abschließend werden das zweite Vorpräzipitat und das Immunpräzipitat zweimal mit Extraktionspuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Um die gebundenen Komplexe zu eluieren, werden 30 µl SDS-Probenpuffer hinzugefügt und die Proben 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Der Überstand kann für weitere Untersuchungen verwendet werden.

#### **5.3.14 Proteinbestimmung**

Proteinbestimmungen werden mit Hilfe des Protein Assay der Firma Bio-Rad, München durchgeführt. Hierzu werden 800 µl destilliertes Wasser zusammen mit 200 µl des Bio-Rad Reagenz in eine Plastikkuvette vorgelegt. Es folgt die Zugabe von 1 µl des zu bestimmenden Proteins, ein kurzes Durchmischen auf dem Vortex und eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend kann die Absorption bei OD<sub>595nm</sub> gegen einen Leerwert gemessen werden, welcher 1 µl des Extraktionspuffers enthält. Ermittelt wird die Proteinkonzentration durch eine zuvor angelegte Eichgerade, bei der eine Proteinbestimmung mit steigenden Mengen an BSA durchgeführt wird.

#### **5.3.15 Fällung von Proteinen**

Zur Konzentration von Proteinen aus einer Lösung und einer späteren Analyse von assoziierten Proteinen, kann man sie mit Hilfe von Aceton fällen. Hierzu wird das doppelte Volumen an eiskaltem Aceton zum Proteinextrakt gegeben und die Lösung für mindestens 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 4°C und 15000xg, bei dem die gelösten Proteine ausfallen und sich am Boden des Reaktionsgefäßes konzentrieren. Anschließend kann der Überstand verworfen und die gefällten Proteine mit eiskaltem Methanol erneut für 10 Minuten bei 4°C und 15000xg zentrifugiert werden. Man entfernt das Methanol und trocknen die Proben für 2 Minuten bei 95°C. Abschließend wird das Pellet in einer geeigneten Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen und denaturiert. Dann kann es für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

### 5.3.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen werden SDS-Polyacrylamidgele mit einer Acrylamid-Konzentration von 12.5%, 10% und 7.5% im Trenngel und 4.3% im Sammelgel verwendet. Die Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung wird im Verhältnis 30:0.8 eingesetzt. Das Trenngel setzt sich zusammen aus der Acrylamid-Lösung, Tris-HCl-Puffer (375 mM, pH 8.8), APS (0.1% (w/v) und 0.2% (v/v) TEMED. Das Sammelgel besteht aus den gleichen Bestandteilen wie das Trenngel mit dem Unterschied, dass 0.05% (w/v) APS, 0.06% TEMED sowie 125 mM Tris-HCl-Puffer, pH 6.8 verwendet werden. Die Geldicke beträgt 1 mm. Die in SDS-Probenpuffer gelösten Proteine werden in die Geltaschen auf der Kathodenseite pipettiert und mit Elektrophoresepuffer bei 25 mA pro Minigel aufgetrennt. Die Elektrophorese ist beendet, wenn die Bromphenolblaufront der mit SDS-Probenpuffer versetzten Proteine den unteren Gelrand erreicht.

### 5.3.17 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine können mittels Coomassie-Blau Färbung visualisiert werden. Hierzu werden die Gele mindestens 30 Minuten in der Coomassie-Blau Lösung unter Schwenken gefärbt, um sie anschließend in der Entfärbelösung so lange zu inkubieren, bis deutliche Proteinbanden erkennbar sind.

### 5.3.18 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine können mit Hilfe von Röntgenfilmen autoradiographisch sichtbar gemacht werden. Nach Beendigung der Elektrophorese und einer eventuellen Coomassie-Blau Färbung wird das Gel 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet und auf einem Agfa Cronex Röntgenfilm für mehrere Stunden oder Tage exponiert.

### 5.3.19 Westernblot

Bei der Westernblot Analyse werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem unfixierten Trenngel auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Übertragung der Proteine erfolgt mittels Sandwichblot in einem mit Transferpuffer gefluteten Tank über Nacht bei 120

mA. Die immobilisierten Proteine auf der Matrix besitzen noch ihre Immunreaktivität und können so mit Hilfe von Antikörpern oder Enzymsubstraten quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden.

### **5.3.20 Immunologischer Nachweis der Proteine**

Die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen wird mindestens 1 Stunde in Waschpuffer (0.1% (v/v) Tween 20 in PBS) mit 5% Magermilchpulver geschwenkt, um unspezifische Bindungen des Nachweisantikörpers an die Membran zu verhindern. Dann inkubiert man die Membran 1 bis 2 Stunden in gewünschter Verdünnung in Waschpuffer mit 1% (w/v) Magermilchpulver mit der gewünschten Antikörperverdünnung. Zur Entfernung von nicht gebundenem Antikörper, wäscht man die Membran mehrmals mit Waschpuffer mit 1% (w/v) Magermilch. Es folgt eine 1- bis 2-stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper in geeigneter Verdünnung mit Waschpuffer mit 1% (w/v) Magermilch. Der sekundäre Antikörper ist an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und bindet an den F<sub>C</sub>-Teil des Primärantikörpers. Nach mehrmaligem Spülen der Membran mit Waschpuffer, kann die Membran mit Hilfe des ECL-Reagenz nach Angabe des Herstellers entwickelt werden.

### **5.3.21 Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Säugerzellen**

Lokalisationsanalysen in Säugerzellen werden mit Hilfe der Immunfluoreszenz durchgeführt. Man sät Zellen am Vortag auf sterile Deckgläschen aus und kultiviert sie bis zu einer Konfluenz von etwa 75 - 80%. Anschließend wird das Medium entfernt, die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen und entweder mit 3.75% Formaldehyd oder mit eiskaltem Methanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (10 min) permeabilisiert man die Zellen durch 10-minütige Inkubation in 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS. Es folgt ein dreimaliger Waschschrift in PBS, um danach die Zellen für 10 Minuten mit 10% BSA (w/v) in PBS zu überschichten; dieser Schritt dient der Absättigung unspezifischer Bindungen des im Folgenden verwendeten Antikörpers. Die Deckgläschen werden in eine feuchte Kammer überführt und mit 50 µl der Antikörper-Verdünnung für 30 Minuten bei 37°C oder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle sollte grundsätzlich ein Deckgläschen nur mit PBS behandelt werden. Erneut erfolgt ein dreimaliger Waschschrift mit PBS und danach die Zugabe von 50 µl des fluoreszenzmarkierten

Sekundärantikörpers (ALEXA488 oder ALEXA594) für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wäscht man die Zellen mehrmals in PBS und färbt die DNA mittels 4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI). Abschließend werden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen, um sie mit Hilfe von 5 µl Mounting Medium (5% (v/v) Polyvinylalkohol 25/140, 10% Glycerin in PBS) auf Objektträgern zu fixieren. Die so fertig gestellten Untersuchungsobjekte können bei 4°C im Dunkeln für 1-2 Tage gelagert oder an einem Fluoreszenz-Mikroskop direkt betrachtet werden. Zur längerfristigen Aufbewahrung empfiehlt sich ein Verschließen des auf dem Objektträger fixierten Deckgläschens mit Nagellack und die Lagerung bei -20°C.

### **5.3.22 Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Gewebeschnitten**

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation an Paraffin-Gewebeschnitten müssen die Objektträger mit den aufliegenden Proben zuerst deparaffiniert werden. Dazu wird der Objektträger zweimal 10 Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend rehydriert man die Probe durch eine absteigende Ethanolreihe (100% Ethanol: 10 Minuten; 95% Ethanol: 5 Minuten; 70%: 1 Minute). Der Träger wird 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen und dann in Citratpuffer (Citronensäuremonohydrat 4.2 g/2 l, pH 6.0) in der Mikrowelle kurze Zeit erhitzt. Nach 15-minütiger Abkühlung erfolgen zwei Waschschrte in destilliertem Wasser und in PBS mit 0.01% Triton X-100. Nach erneutem Waschen der Gewebe mit PBS werden nicht-spezifische Bindungsstellen des Antikörpers auf dem Gewebe durch 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (10% (w/v) FCS, 4% (w/v) Magermilchpulver in PBS) abgesättigt. Es folgt die Zugabe des Primärantikörpers in geeigneter PBS-Verdünnung und eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird der Sekundärantikörper in einer feuchten Kammer auf das Gewebe gegeben und 1h inkubiert. Der überschüssige, nicht gebundene Sekundärantikörper wird durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Danach wäscht man den Objektträger mit destilliertem Wasser und trocknet ihn so gut wie möglich, bevor er mit Mounting Medium und einem Deckglas verschlossen wird.

### **5.3.23 *In vitro* Kinasereaktion mit der Proteinkinase CK2**

Für Phosphorylierungsreaktionen wird rekombinante CK2 zusammen mit 1 µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP und 1 - 2 µg des gereinigten Substratproteins in Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100

mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze werden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 3 Minuten bei 95°C denaturiert und über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels wird ein Röntgenfilm aufgelegt und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie bestimmt.

#### **5.3.24 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen mit Peptidfiltern**

Mit Hilfe von Peptidfiltern kann man einen Aufschluss über mögliche CK2-Phosphorylierungsstellen innerhalb eines Proteins gewinnen. Hierzu werden die potentiellen Phosphorylierungsstellen als Zehnerpeptide auf einen Whatman-Filter gespottet. Diese Filter werden 1 Stunde bei Raumtemperatur in Methanol geschwenkt und dann 1 Stunde mit 1% BSA in Kinasepuffer inkubiert. Die Phosphorylierungsreaktion sollte, abhängig von der Filtergröße, in möglichst wenig Kinasepuffer mit 3 µg CK2 und 10 µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP 1 Stunde bei 30°C erfolgen. Im Anschluss wird der Filter einmal mit Kinasepuffer, dreimal mit Kinasepuffer mit 1 M NaCl gewaschen und getrocknet. Phosphorylierungen werden in der Autoradiographie als runde Spots sichtbar.

#### **5.3.25 Aktivitätsbestimmung der CK2 in Zellextrakten und am Immunpräzipitat**

Die Aktivität der Proteinkinase CK2 wird über die Phosphorylierung des CK2 spezifischen Substratpeptids RRRDDDSDDD (Kuenzel & Krebs, 1985) mit <sup>32</sup>P-γ-ATP bestimmt. Für Aktivitätsbestimmungen an Zellextrakten wird die zu untersuchende Probe (20 µg Extrakt) mit dem zuvor verwendeten Extraktionspuffer auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt; bei Immunpräzipitaten werden die gebundenen Immunkomplexe in 20 µl Kinasepuffer resuspendiert. Der Start der Reaktion beginnt mit der Zugabe von 30 µl CK2-Reaktionsmix, welcher mit 10 µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP pro 500 µl Reaktionsmix versetzt wird. Die Proben werden 5 Minuten bei 37°C inkubiert und dann zum Abstoppen der Reaktion auf Eis gestellt. Aus den einzelnen Ansätzen werden je 30 µl auf ein P81 Kationenaustausch Filterpapier pipettiert und anschließend dreimal 5 Minuten mit 85 mM Phosphorsäure und einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem die Filter an der Luft getrocknet sind, werden sie in Szintillationsgefäße überführt und die Phosphorylierung des Substratpeptids im Szintillationszähler durch einminütige Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt. Die gemessene Aktivität wird in Zerfällen pro Minute (counts per minute, cpm) angegeben. Es ist zu beachten, dass zwei

Nullwerte mitgeführt werden müssen: eine Pufferkontrolle, die nach dem Abstoppen nicht gewaschen wird und die Gesamtaktivität des Reaktionsmixes repräsentiert und eine Pufferkontrolle, welche die gleiche Behandlung erfährt wie die untersuchten Proben. Der gemessene Wert der zweiten Pufferkontrolle muss von allen übrigen Werten abgezogen werden.

### 5.3.26 ATPase-Versuch unter „steady state“ Bedingungen

Zur Bestimmung ATPase-Aktivität von KIF5C wird ein radioaktiver ATPase-Versuch mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP durchgeführt. Die ATPase-Aktivität kann durch die Menge an freigesetztem, radioaktivem  $\text{P}_i$  ermittelt werden. Es werden 500 ng des gereinigten Proteins mit ATPase-Puffer (40 mM HEPES/KOH, 25 mM KCl, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4) auf ein Endvolumen von 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zum Starten der Reaktion erfolgt die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  ATPase-Puffer, welcher neben 1  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP zusätzlich 500  $\mu\text{M}$  nicht-radioaktives ATP enthält. Die Inkubation der Ansätze erfolgt bei 37°C, nach 2, 5, 10, 30 und 60 Minuten werden jeweils 3  $\mu\text{l}$  entnommen und die Reaktion mit 3  $\mu\text{l}$  EDTA (60 mM) abgestoppt. Daraufhin werden den einzelnen Proben jeweils 4  $\mu\text{l}$  entnommen, auf eine halbierte Dünnschichtchromatographie-Platte (DC-Platte) aus Polyethylenimin im Abstand von 1.5 cm aufgetragen und im Fließmittel (1 M Formiat, 0.5 M LiCl) bis etwa 1.5 cm vor dem oberen Ende der DC-Platte inkubiert. Nach Entnahme der DC-Platten werden sie mit einem Kaltluft-Fön getrocknet und in Frischhaltefolie verpackt. Abschließend wird eine Phosphoscreen-Platte aufgelegt und nach 45 Minuten am Phosphoimager gescannt. Die Quantifizierung des freigesetzten  $\text{P}_i$  und des verbliebenen ATP erfolgt mit Hilfe des Computerprogrammes ImageQuant 5.1. Die Berechnung der Menge an hydrolisiertem ATP erfolgt über die Formel:

$$\text{Hydrolisiertes ATP } (\mu\text{M}) = (\text{P}_i / [\gamma^{32}\text{P}]\text{P}_i) / ([\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP} + [\gamma^{32}\text{P}]\text{P}_i) * 250 \mu\text{M}$$

## 5.4 Hefetechnische Methoden

### 5.4.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine Methode, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen mit einer hohen Sensitivität zu identifizieren und zu charakterisieren. Es können hierbei unbekannte spezifische Interaktionspartner durch das Screenen einer cDNA-Bibliothek gefunden werden. Benutzt wurde das „MATCHMAKER Two Hybrid System 3“ der Firma BD Clontech, welches sich den Gal-Promotor zu Nutze macht, der an der Regulation des Galactose-Stoffwechsels beteiligt ist. Außer der Bindestelle für die RNA-Polymerase enthält dieser Promotor eine UAS-Region, an die das Gal4-Protein binden und so die Transkription fördern kann. Bei dem Gal4-Protein handelt es sich um einen regulierbaren Transkriptionsfaktor, der erst aktiviert wird wenn dem Medium Galactose zugefügt wird. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System fördert er die Transkription des  $\beta$ -Galactosidase-Gens, welches durch seine Aktivierung eine Farbreaktion hervorruft. Das Gal4-Protein besitzt sowohl eine Aktivierungsdomäne (AD) für die RNA-Polymerase, als auch eine DNA-Bindungsdomäne (BD), durch die das Protein an die UAS-Region bindet. Diese beiden Domänen sind in verschiedenen Shuttlevektoren einkloniert, die sowohl in Hefen als auch in Bakterien repliziert werden können: den BD-Vektor, welcher den so genannten Köder für die gesuchten Interaktionspartner darstellt und den AD-Vektor, in welchen die potentiell interagierenden Partner einkloniert werden können. Diese beiden Vektoren werden in den Hefestamm AH109 transformiert, welcher in Bezug auf seine Aminosäureproduktion ein Defizit aufweist. Nach der Transformation streicht man die Hefen auf einem doppelten Selektionsnährboden aus. Nur diejenigen Hefen können wachsen, die beide Vektoren aufgenommen und so ihre Aminosäureproduktion wieder komplettiert haben. Der einklonierten „Köder“-Sequenz ist die Sequenz für die DNA-Bindungs-Domäne vorangesetzt, so dass nach erfolgreicher Transformation ein Fusionsprotein aus DNA-Bindungsdomäne und Aktivierungsdomäne entsteht. Dieses Fusionsprotein bindet an die GAL4-transkriptionelle Aktivator-Sequenz, die die Transkription des Reporter-Gens steuert. Positive Interaktionsklone führen so zur Induktion der  $\beta$ -Galactosidase und sind daher durch einen X-Gal Test leicht zu identifizieren.

### 5.4.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von untransformierten Hefen des Stammes AH109 erfolgt entweder auf YPD-Vollmedium-Agarplatten oder in YPD-Vollmedium-Flüssigkultur bei 30°C. Transformierte Hefen kultiviert man in SD-Minimalmedium, welches für die Selektionierung auf bestimmte auxotrophe Fähigkeiten geeignet ist. Der Hefestamm AH109 ist defizient für die Synthese von Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan. Durch erfolgreiche Kotransformation des AD- und BD-Plasmids kann die Leucin- und Tryptophan-Auxotrophie komplementiert werden. Das Adenin- und Histidin-Defizit wird durch Interaktion von Köder- und Beuteprotein ausgeglichen.

### 5.4.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Bei der Transformation von Hefen wird die Lithiumacetat-Methode verwendet. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass Hefen durch Alkali-Ionen kompetent für eine DNA-Aufnahme werden. Man inkubiert die Hefen in gepuffertem Lithiumacetat und fügt eine Carrier-DNA zusammen mit der zu transformierenden DNA hinzu. Durch die Zugabe von Polyethylenglycol (PEG) und einem 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C wird die DNA-Aufnahme erleichtert. Abschließend können die Hefen auf den geeigneten Selektionsmedium-Platten ausgestrichen und bei 30°C bis zu einem Wachstum bebrütet werden. Die Hefe-Transformation wurde nach den Angaben des Protokolls von BD Clontech, Heidelberg durchgeführt.

### 5.4.4 X-Gal-Test

Mit Hilfe des X-Gal-Test kann durch qualitative Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität eine positive Interaktion nachgewiesen werden. Hierzu werden die auf SD-Mangelmedium-Agarplatten gewachsenen Hefekolonien mittels eines Rundfilters auf SD-Mangelmedium-Agarplatten mit  $\alpha$ -X-Gal transferiert. Diese Agarplatten werden solange bei 30°C inkubiert bis die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase durch eine Blaufärbung der Kolonien deutlich zu erkennen ist. Die so identifizierten positiven Klone können anschließend einer genaueren Untersuchung unterzogen werden.



#### **5.4.5 Plasmidisolierung aus *Saccharomyces cerevisiae***

Zur Extraktion von DNA aus Hefen wird der Abstrich einer Impföse des gewünschten Hefeklons in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Durch die Zugabe von 5 µl Zymolyase oder Lyticase (10 mg/ml in bidestilliertem Wasser) und einer Inkubation bei 37°C für 1 - 3 Stunden werden die Zellwände der Hefen lysiert. Nach dem Auflösen der Hefezellwand kann das Plasmid über eine alkalische Lyse gewonnen werden. Diese alkalische Lyse wird analog und mit den gleichen Puffern durchgeführt wie die Plasmidpräparation aus Bakterien.

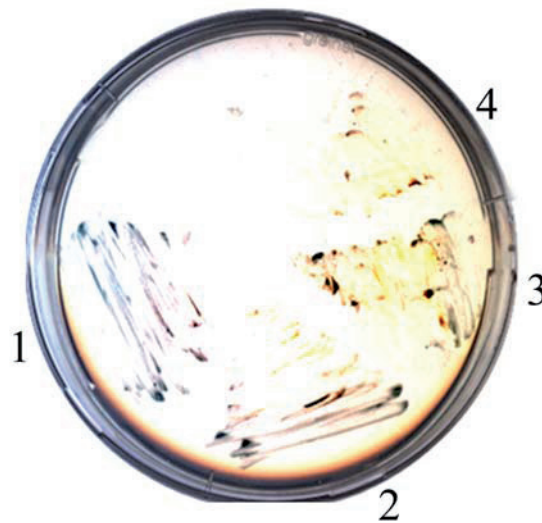
## 6. Ergebnisse

Obwohl die Proteinkinase CK2 bereits 1954 erstmals beschrieben wurde, ist es bis heute nicht gelungen ihre Funktionen in der Zelle komplett zu erfassen. Der Versuch, die Rolle der CK2 über ihre Substrate aufzuklären, wurde jedoch schnell durch die Entdeckung einer Fülle von Substraten kompliziert. Diese Substrate sind an den verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt. Strukturanalysen der Proteinkinase CK2 konnten zwar den Aufbau des Holoenzym und der Untereinheiten klären, die biologische Relevanz der CK2 blieb aber auch weiterhin im Dunkeln. Viele Untersuchungen haben inzwischen gezeigt, dass das tetramere Holoenzym nicht die einzige Existenzform der Proteinkinase CK2 ist, sondern dass die einzelnen Untereinheiten auch frei in der Zelle vorliegen können. Dieser Ansatz eröffnete die Möglichkeit, spezifische Interaktionspartner für die Untereinheiten zu identifizieren, um so die Funktion der CK2 in der Zelle zu verstehen. Von Interesse sind hierbei die katalytischen  $\alpha$ - und  $\alpha'$ -Untereinheiten, da sie sich zwar sehr ähnlich sind, man jedoch annimmt, dass sie in der Zelle unterschiedliche Funktionen besitzen.

### 6.1 Die Aufarbeitung der Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung für die katalytische $\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2

Da es von großem Interesse ist neue Interaktionspartner für die Proteinkinase CK2 zu finden, welche möglicherweise mit der Regulation der Proteinkinase CK2 in Verbindung stehen, wurde eine von G. Kaul früher durchgeführte Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung mit der katalytischen CK2 $\alpha$ -Untereinheit als Fänger aufgearbeitet (Kaul, 2003). Hierzu wurden die auf Grund des Wachstums auf Mangelmediumplatten als positiv identifizierten und bei -80°C gelagerten Hefeklonen erneut auf Solid Dropout (SD)-Agarplatten ausgestrichen. Nach dem Anwachsen der einzelnen Hefeklonen wurden sie auf SD-Mangelmediumplatten transferiert, welche zusätzlich mit X-Gal versetzt wurden. Somit konnte eine Interaktion nicht nur auf Grund der Aminosäurekomplettierung der Hefen detektiert, sondern auch mittels eines Blau-Weiß-Screens zusätzlich spezifiziert werden. Aus blauen Hefekolonien wurde die DNA extrahiert, in *E. coli* XL1 blue transformiert und schließlich die DNA erneut aus den Bakterien präpariert. Diese wurde dann mit Hilfe eines spezifischen Primers sequenziert. Wie in Abbildung 3 zu erkennen ist, kann bei der Positivkontrolle bestehend aus Hefen, die mit der

katalytischen  $\alpha$ - und der regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit kotransformiert wurden, ein Wachstum und eine Blaufärbung im X-Gal-Test detektiert werden. Dieses Wachstum kann bei der Negativkontrolle, bei der pGBKT7-CK2 $\alpha$  zusammen mit dem Aktivierungsdomänen-Plasmid pGADT7 in Hefen kotransformiert wurden, nicht detektiert werden. Die beiden in Abbildung 3 dargestellten Klone (H55 und H64) dienen der exemplarischen Visualisierung der 15 untersuchten Hefeklone. Somit kann gezeigt werden, dass die Hefeklone nach 3-jähriger Lagerung bei -80°C noch immer für eine Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung geeignet sind.



**Abbildung 3:** Blau-Weiß-Test auf positive Interaktion mit der katalytischen CK2 $\alpha$ -Untereinheit.

Die von G. Kaul bereits als Interaktionspartner identifizierten Hefeklone wurden zuerst auf SD-Leu/-Trp-Agarplatten ausgestrichen. Nach dem Wachstum wurden die Klone auf SD-Leu/-Trp/-His/-Ade/+X-Gal-Mangelmedium-Platten überimpft, um die Interaktion durch eine Blaufärbung zu verifizieren. Als Positivkontrolle diente eine Kotransformation von pGBKT7-CK2 $\alpha$  und pACT2-CK2 $\beta$ , als Negativkontrolle wurde eine Kotransformation von pGBKT7-CK2 $\alpha$  und pGADT7 mitgeführt. 1: pGBKT7-CK2 $\alpha$  + pACT2-CK2 $\beta$ , 2: pGBKT7-CK2 $\alpha$  + Klon H55, 3: pGBKT7-CK2 $\alpha$  + Klon H64, 4: pGBKT7-CK2 $\alpha$  + pGADT7.

## **6.2 Das der Kinesin Heavy Chain-Familie zugehörige KIF5C ist ein Interaktionspartner der katalytischen $\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2**

Insgesamt wurden 15 positive Hefeklone aus der zuvor durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse untersucht. Dabei konnten als CK2 $\alpha$ -Interaktionspartner die regulatorische CK2 $\beta$ -Untereinheit, das Protein Gametogenetin und das Cold Shock Domain Protein YB1

identifiziert werden, auf die im Weiteren jedoch nicht eingegangen wird. Des Weiteren konnten 2 Klone durch Sequenzierung als DNA-Fragmente des neuronenspezifischen Motorproteins KIF5C identifiziert werden. Die identifizierte DNA-Sequenz entsprach den Aminosäuren von 254 - 349 innerhalb der Polypeptidkette von KIF5C. Es handelt sich bei diesem Protein um ein Mitglied der Kinesin-1-Familie (Kinesin Heavy Chains, KHC), zu der auch das ubiquitär vorkommende KIF5B und das neuronspezifische KIF5A gehören (Kanai *et al.*, 2000). Diese Familie bildet zusammen mit der Gruppe der leichten Ketten einen tetrameren Komplex, das konventionelle Kinesin, welches sich durch Hydrolyse von ATP an Mikrotubuli entlang bewegt (Vallee & Sheptner, 1990). Kinesin-1 ist verantwortlich für den anterograden Transport von Vesikeln, Proteinen, Mitochondrien und anderen Molekülen entlang der Mikrotubuli (Hirokawa *et al.*, 1991; Hackney, 1994).

### 6.3 Die Identifikation der Bindungsregion der katalytischen CK2-Untereinheiten innerhalb des Motorproteins KIF5C

Das neuronale Protein KIF5C gehört wie seine beiden Familienmitglieder KIF5A und KIF5B zur Kinesin-1-Gruppe, den so genannten schweren Ketten. Diese schweren Ketten bestehen aus etwa 1000 Aminosäuren und besitzen ein Molekulargewicht von 100 - 120 kDa. Die Polypeptidkette der Proteine lässt sich in zwei Regionen aufteilen: eine Motordomäne von Aminosäure 1 - 335 mit ATPase-Funktion zur Generierung der Bewegung an den Mikrotubuli und eine Nicht-Motordomäne von Aminosäure 336 - 957, an der die leichten Kinesin-Ketten oder andere zu transportierende Proteine andocken können (Abb. 4). Zur genaueren Kartierung der Bindungsstelle der katalytischen CK2 $\alpha$ -Untereinheit auf dem KIF5C-Protein wurde im Folgenden eine weitere Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse durchgeführt.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung von KIF5C bestehend aus der Motordomäne (dunkel-grau, AS 1 - 335) und der Nicht-Motordomäne (hell-grau, AS 336 - 957).

### 6.3.1 Herstellung der benötigten DNA-Konstrukte

Von Prof. Nagase vom Kazusa Research Centre in Japan wurde der Vektor pBlueskript II SK(+) KIAA0531 zur Verfügung gestellt, in welchen die DNA-Sequenz für KIF5C über die Restriktionsschnittstellen Sall/NotI einkloniert war. Mittels PCR wurde sowohl die Motordomäne (MD) von Aminosäure 1 bis 335 als auch die Nicht-Motordomäne (NMD) von Aminosäure 336 bis 957 mit EcoRI Schnittstellen versehen, in den Hefevektor pGADT7 subkloniert und die DNA-Sequenz durch Sequenzierung verifiziert. Die benötigten Bindungsdomänen-Vektoren mit den katalytischen CK2-Untereinheiten pGBKT7-CK2 $\alpha$  und pGBKT7-CK2 $\alpha'$  wurden bereits im Vorfeld von G. Kaul (2003) und S. Lehnert (Lehnert *et al.*, 2007) hergestellt.

### 6.3.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen

Da sämtliche Vorversuche (autonome Interaktion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne und Expressionskontrolle) zu den beiden Köderproteinen von G. Kaul und S. Lehnert bereits durchgeführt wurden, wird auf diese Kontrollexperimente in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen. Die beiden Vektoren pGADT7-KIF5C MD und pGADT7-KIF5C NMD wurden zusammen mit den Ködervektoren für die katalytischen CK2-Untereinheiten in Hefen des Stammes AH109 kotransformiert und auf SD-Leu/-Trp-Medien ausgestrichen. Nach drei Tagen wurden die Hefekolonien auf SD-Leu/-Trp/-His/-Ade-Medien ausplattiert und erneut bebrütet. Zur zusätzlichen Verifizierung einer positiven Interaktion wurde an den gewachsenen Hefekolonien ein Blau-Weiß-Test mit X-Gal durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Kotransformation von pGBKT7-CK2 $\alpha$  bzw. -CK2 $\alpha'$  mit dem Leervektor pGADT7. Als Positivkontrolle diente eine Kotransformation von pGBKT7-CK2 $\alpha$  bzw. -CK2 $\alpha'$  mit pACT2-CK2 $\beta$ . Wie in Tabelle 1 dargestellt, wachsen alle transformierten Hefen auf SD-Leu/-Trp-Platten. Dies spricht für eine erfolgreiche Kotransformation. Des Weiteren kann ein Wachstum auf SD-Leu/-Trp/-His/-Ade-Medien und eine Blaufärbung der Hefekolonien nur bei der Kotransformation der katalytischen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  mit der CK2 $\beta$ -Untereinheit und der Motordomäne von KIF5C beobachtet werden. Bei der Kotransformation von pGBKT7-CK2 $\alpha$  bzw. -CK2 $\alpha'$  mit der Negativkontrolle und der Nicht-Motordomäne von KIF5C kann weder ein Wachstum noch eine Blaufärbung detektiert werden. Somit interagieren sowohl CK2 $\alpha$  als auch CK2 $\alpha'$  mit der Motordomäne (AS 1 - 335) von KIF5C und nicht mit der Nicht-Motordomäne (AS 336 - 957).

BD-Vektor	AD-Vektor	Wachstum auf SD-Leu/-Trp-Medien	Blau-Weiß-Test auf SD-Leu/-Trp/-His/-Ade-Medien
pGBKT7-CK2 $\alpha$	pGADT7	+	-
	pGADT7-KIF5C MD	+	+
	pGADT7-KIF5C NMD	+	-
	pACT2-CK2 $\beta$	+	+
pGBKT7-CK2 $\alpha'$	pGADT7	+	-
	pGADT7-KIF5C MD	+	+
	pGADT7-KIF5C NMD	+	-
	pACT2-CK2 $\beta$	+	+

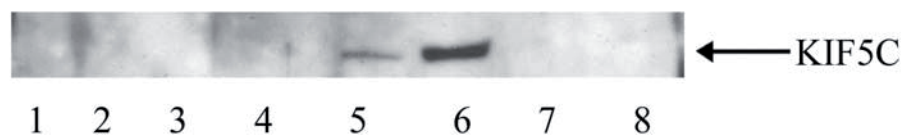
**Tabelle 1:** Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse der katalytischen CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten mit KIF5C.

AH 109 Hefen wurden mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode mit den Plasmiden pGBKT7-CK2 $\alpha$  bzw. pGBKT7-CK2 $\alpha'$  und den Vektoren pGADT7-KIF5C MD (AS 1 - 335), pGADT7-KIF5C NMD (AS 336 - 957), pGADT7 und pACT2-CK2 $\beta$  kotransformiert und auf SD-Leu/-Trp-Agarplatten ausgestrichen. Nach Wachstum der Hefen wurden die Klone mittels eines Filterabklatsch auf SD-Leu/-Trp-Agarplatten transferiert. Nach etwa einer Woche wurde mittels SD-Leu/-Trp/-Leu/-Ade-Mangelmediumplatten, in welche zusätzlich  $\alpha$ -X-Gal gegossen wurde, ein Blau-Weiß-Test durchgeführt. +: Wachstum/ Blaufärbung; -: kein Wachstum/Blaufärbung.

#### 6.4 Die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und die Mauszelllinie NSC34 enthalten KIF5C

Da es sich bei dem Kinesin Heavy Chain Mitglied KIF5C um ein Motorprotein handelt, welches im Cytoplasma von Neuronen exprimiert wird (Kanai *et al.*, 2000), wurde nach einem geeignetem Zellsystem gesucht, in welchem spätere Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Im Westernblot wurden verschiedene, im Labor zu diesem Zeitpunkt kultivierte Zelllinien auf das Vorhandensein von KIF5C untersucht. Bei diesen Zelllinien handelte es sich um COS-1, eine Nierenzelllinie aus grünen Meerkatzen und HEK-293, eine humane embryonale Nierenzelllinie. Des Weiteren sollten die Prostatazelllinien EPN und LNCaP und die humanen Colonkarzinomzelllinien HCT (wt und p53 defizient) untersucht werden. Zusätzlich wurden die humane Neuroblastomlinie SH-SY5Y von Dr. Oliver Wirths

(Neurologie, Universität Homburg) und die murine Motorneuronzelllinie NSC34 von Prof. Neil Cashman, Toronto zur Verfügung gestellt. Aus sämtlichen Zelllinien wurde das Cytoplasma extrahiert und jeweils 100 µg Gesamt-Protein im Cytoplasmaextrakt über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion von KIF5C erfolgte im Westernblot mit Hilfe des spezifischen Antikörpers H1. In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass KIF5C weder in COS-1 noch in HEK-293 detektiert werden kann. Des Weiteren erweisen sich auch die Prostatazelllinien EPN und LNCaP als negativ für KIF5C. Auch die beiden Varianten der Zelllinie HCT (wt und p53-defizient) zeigen keine KIF5C Expression. Nur SH-SY5Y und NSC 34 sind positiv für KIF5C. Man erkennt in diesen beiden Zelllinien jedoch, dass in NSC 34 Zellen deutlich weniger KIF5C nachweisbar ist als in SH-SY5Y Zellen. Somit werden SH-SY5Y-Zellen für alle weiteren Experimente verwendet.



**Abbildung 5:** Detektion von KIF5C in verschiedenen Zelllinien.

Das Cytoplasma aus 8 verschiedenen Zelllinien wurde extrahiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und jeweils 100 µg über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde diese mit dem KIF5C spezifischen Mausantikörper H1 dekoriert (Verdünnung 1:1000). Als Sekundärantikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels ECL-Methode. 1: COS-1-, 2: HEK-293-, 3: EPN-, 4: LNCaP-, 5: NSC 34-, 6: SH-SY5Y-, 7: HCT (wt)-, 8: HCT (p53-defizienter)-Cytoplasmaextrakt.

## 6.5 Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums gegen KIF5C

Für weitere Interaktionsversuche der Proteinkinase CK2 mit KIF5C sollte neben dem monoklonalen Mausantikörper H1 ein zusätzlicher spezifischer Antikörper gegen KIF5C zur Verfügung stehen. Daher wurde die Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums in Betracht gezogen. Bei Immunpräzipitations-Analysen ist es von Vorteil zwei spezifische Antikörper aus unterschiedlichen Spezies für den Nachweis eines Proteins zu verwenden, um die Detektionsmöglichkeiten zu verbessern. Da die einzelnen KIF5 Mitglieder eine hohe

Sequenzhomologie aufweisen (Kanai *et al.*, 2000), wurde ein Kaninchenserum hergestellt, welches nur KIF5C spezifisch erkennt. Daher wurde für die Immunisierung eines Kaninchens kein Volllängenprotein sondern eine für KIF5C spezifische Peptidsequenz verwendet. Mittels eines Proteinsequenzvergleiches der einzelnen KHC-Mitglieder wurde eine KIF5C spezifische, 13 Aminosäuren lange, Sequenz ermittelt (Abb. 6). Diese erstreckte sich von Aminosäure 393 bis 405 innerhalb der Polypeptidkette von KIF5C und hatte die Aminosäuresequenz: CDNTPIIDNIAPV.

KIF5A	C E E T P V N D N S S I V
KIF5B	V D K D I T L T N D K P A
KIF5C	C D N T P I I D N I A P V

**Abbildung 6:** Sequenzvergleich der Aminosäuren 393 bis 405 der Kinesin Heavy Chain Mitglieder KIF5A, KIF5B und KIF5C. Mittels des im Internet verwendbaren Programmes ExPASy wurde ein Sequenzvergleich der einzelnen KIF5-Mitglieder durchgeführt, um einen KIF5C spezifischen Kaninchenantikörper herzustellen.

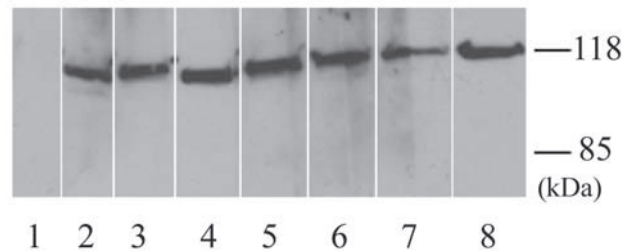
Das Peptid wurde synthetisiert, an Hämocyanin gekoppelt und einem Kaninchen injiziert. Es erfolgten sechs Blutentnahmen in 14-täglichem Rhythmus. Nach 14 Wochen wurde das finale Blut gewonnen.

#### 6.5.1 Das Kaninchenserum #976 ist im Westernblot spezifisch gegen KIF5C gerichtet

Zur Überprüfung der Spezifität des Kaninchensersums #976 wurden im Westernblot je 100 µg Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen einer Analyse mit den einzelnen entnommenen Seren unterzogen. Als Negativkontrolle diente das Kontrollserum, welches dem Kaninchen vor der Peptidinjektion entnommen wurde und somit KIF5C nicht erkennen sollte. Als Positivkontrolle diente der monoklonale Mausantikörper H1. In Abbildung 7 sieht man, dass das Kontrollserum in Spur 1 kein Protein detektiert, wohingegen das Kaninchenserum #976 ab der ersten Blutentnahme (Spur 2) eine positive Reaktion auf dem Cytoplasmaextrakt von SH-SY5Y Zellen zeigt. Man sieht weiterhin, dass sämtliche entnommene Seren (Spur 2 bis 7) nur ein Protein bei etwa 118 kDa erkennen. Durch den Vergleich des KIF5C spezifischen Antikörpers H1 in Spur 8 mit den Kaninchenseren #976 erkennt man, dass beide Antikörper



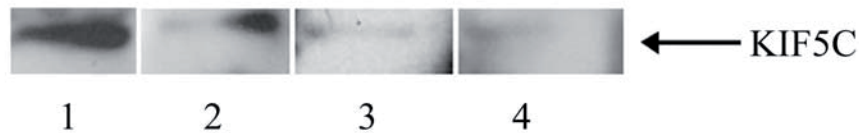
ein Protein von gleichem Molekulargewicht detektieren. Dies bedeutet, dass das Serum #976 KIF5C im Westernblot erkennen kann.



**Abbildung 7:** Überprüfung der Spezifität des Serums #976.

Je 100 µg Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen wurden über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde diese zerschnitten und mit den entnommenen Kaninchenseren (Verdünnung 1:1000) und als Positivkontrolle mit dem KIF5C spezifischen H1-Antikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper für die Kaninchenseren diente ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, für den H1-Antikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit der ECL-Methode. 1: Kontrollserum vor Injektion, 2 - 7: einzelne Serumproben, entnommen in 14-tägigem Rhythmus nach der Immunisierung, 8: H1-Antikörper. Die Molekulargewichte des „prestained“-Molekulargewichtsmarkern von Fermentas sind rechts in der Abbildung angegeben.

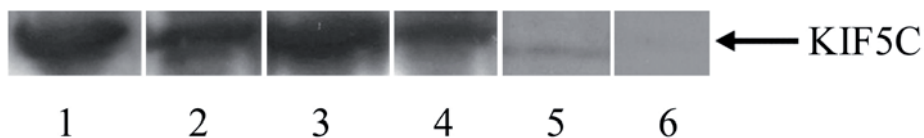
Zur Untersuchung der Spezifität des Kaninchenserums #976 gegen KIF5C wurde im Anschluss eine Kompetitionsuntersuchung durchgeführt. Zu Grunde liegt hierbei die Neutralisierung des Antikörpers durch das der Antigenbindungsstelle komplementäre Peptid. Ein Cytoplasmaextrakt von SH-SY5Y Zellen wurde im Westernblot einer Analyse mit dem Serum #976 unterzogen, jedoch erfolgte eine Vorinkubation des Antikörpers mit steigenden Mengen des neutralisierenden Peptids 976 (0 – 20 µM). Als Positivkontrolle diente ein Ansatz ohne das komplementäre Peptid. Man erkennt in Abbildung 8, dass mit steigenden Mengen des neutralisierenden Peptids die Antigenbindung geschwächt bzw. fast vollständig verhindert werden kann. Somit ist das Kaninchens Serum #976 spezifisch gegen das synthetische Peptid 976 gerichtet, welches den Aminosäuren 393 - 405 innerhalb der Polypeptidkette von KIF5C entspricht.



**Abbildung 8:** Kompetitionsuntersuchung des Serums #976 in SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakten.

Jeweils 50  $\mu\text{g}$  Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen wurden über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die PVDF-Membran in Streifen geschnitten. Das Kaninchenserum #976 wurde mit steigenden Mengen des Peptids 976 (0  $\mu\text{M}$ -20  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und 1 h mit den einzelnen Streifen inkubiert. Nach Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurden die Proteinbanden mit der ECL-Methode detektiert. 1: Serum #976 mit 0  $\mu\text{M}$  Peptid, 2: Serum #976 mit 1  $\mu\text{M}$  Peptid, 3: #976 mit 10  $\mu\text{M}$  Peptid, 4: #976 mit 20  $\mu\text{M}$  Peptid.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass das Serum #976 für den spezifischen Nachweis von KIF5C im Westernblot geeignet war. Abschließend wurde ermittelt, welche Serumverdünnung KIF5C noch ausreichend detektieren konnte. Hierzu wurden im Westernblot an SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakten verschiedene Verdünnungen von 1:1000 bis 1:32000 getestet. Abbildung 9 zeigt, dass Serum #976 bis hin zu einer Verdünnung von 1:16000 (Spur 5) KIF5C noch spezifisch detektieren kann.



**Abbildung 9:** Test von verschiedenen Verdünnungsstufen des Kaninchenserums #976.

Je 100  $\mu\text{g}$  Cytoplasmaextrakt von SH-SY5Y Zellen wurden über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die PVDF-Membran in Streifen geschnitten. Diese Streifen wurden mit verschiedenen Verdünnungen (V) des Serums #976 für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper wurden die Proteine mit der ECL-Methode visualisiert. 1: V 1:1000, 2: V 1:2000, 3: V 1:4000, 4: V 1:8000, 5: V 1:16000, 6: V 1:32000.

### 6.5.2 Das Serum #976 kann KIF5C aus Cytoplasmaextrakten von SH-SY5Y Zellen präzipitieren

Für die in Zukunft geplanten Experimente war es essentiell zu wissen, ob der Antikörper #976 KIF5C auch präzipitieren kann. Daher wurde im Folgenden eine Immunpräzipitations-Studie mit dem Serum #976 in SH-SY5Y Zellen durchgeführt. Hierzu wurde ein SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakt mit Protein A-/CL4B-Sepharose vorpräzipitiert und anschließend zusammen mit dem Serum #976 und Protein A-/CL4B-Sepharose inkubiert. Das Vorpräzipitat und das Immunpräzipitat wurden identisch gewaschen und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle wurde das Serum #976 mitgeführt. Zusätzlich diente ein Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen als Positivkontrolle für den spezifischen Nachweis von KIF5C. Der Nachweis des präzipitierten KIF5C erfolgte mit dem Antikörper H1. Das Ergebnis der Immunpräzipitations-Untersuchung in Abbildung 10 zeigt, dass sowohl das Vorpräzipitat als auch die Serumkontrolle keine Reaktion mit dem Antikörper H1 zeigen. Am Immunpräzipitat (IP) und im Cytoplasmaextrakt von SH-SY5Y Zellen kann KIF5C hingegen deutlich nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bedeutet, dass KIF5C durch das Serum #976 aus SH-SY5Y Zellen präzipitiert und somit für nachfolgende Untersuchungen verwendet werden kann.

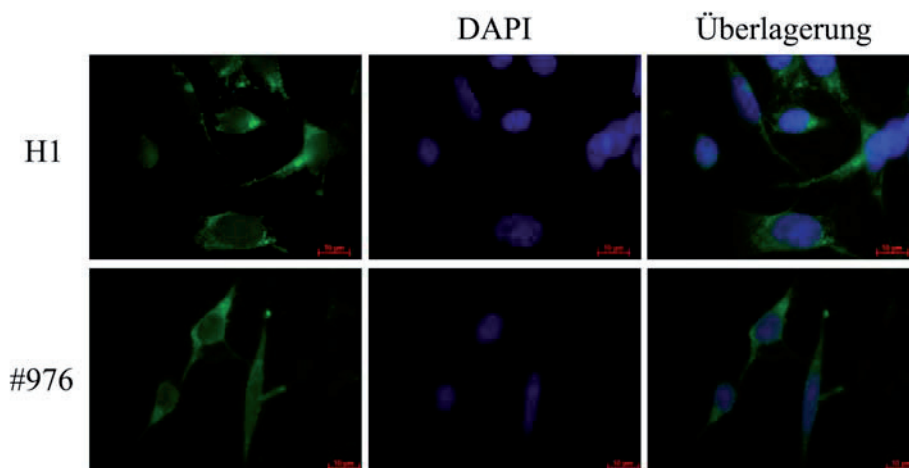


**Abbildung 10:** Immunpräzipitations-Untersuchung von KIF5C am Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen.

Fünfhundert µg Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen wurde mit Protein A-/CL4B-Sepharose vorpräzipitiert und danach mit Serum #976 und Protein A-/CL4B-Sepharose inkubiert. Das gewaschene Immunpräzipitat (IP), das 2. Vorpräzipitat (2.VP), die Antikörperkontrolle #976 und 250 µg SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakt wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis von KIF5C im Westernblot erfolgte mit dem Mausantikörper H1, dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und der Visualisierung mit der ECL-Methode.

### 6.5.3 Das Serum #976 kann KIF5C in Immunfluoreszenz-Untersuchungen nachweisen

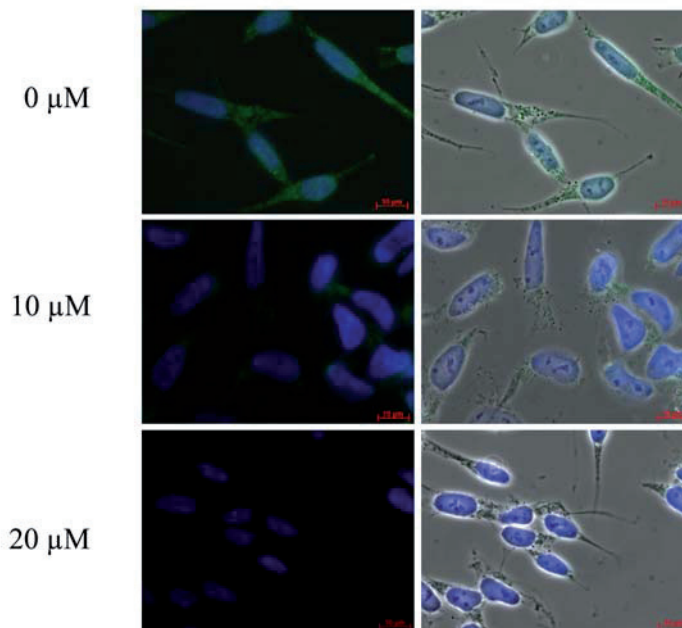
Für eine Untersuchung zur subzellulären Lokalisation ist es notwendig, dass der betreffende Antikörper das Protein in der Immunfluoreszenz-Analyse spezifisch detektiert. Daher wurden im Folgenden Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit dem Kaninchenserum #976 gegen KIF5C durchgeführt. Als Untersuchungsobjekt wurden SH-SY5Y Zellen auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und mit Serum #976 inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper. Zur Kontrolle wurde eine Immunfluoreszenzstudie mit dem Mausantikörper H1 und dem entsprechenden Sekundärantikörper durchgeführt. Zusätzlich diente eine DAPI-Färbung der Detektion der Zellkerne und der genauen Bestimmung der subzellulären Lokalisation von KIF5C. Wie in Abbildung 11 zu sehen, können sowohl Serum #976 als auch der Mausantikörper H1 ein cytoplasmatisches Signal detektieren. Dieses Signal ist bei einer Überlagerung mit der durchgeführten DAPI-Färbung am deutlichsten rund um den Zellkern zu erkennen. Ein Vergleich der Fluoreszenz von Serum #976 mit dem Antikörper H1 ergibt keine Unterschiede zwischen den cytoplasmatischen KIF5C-Fluoreszenzen. Dieses Ergebnis bedeutet, dass das Serum #976 KIF5C bei einer Immunfluoreszenz-Untersuchung in SH-SY5Y Zellen erkennt.



**Abbildung 11:** Immunfluoreszenz-Untersuchung von KIF5C in SH-SY5Y Zellen mit verschiedenen Antikörpern.

SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit 3.75% Formaldehyd fixiert und mit 0.5% Triton X-100 permeabilisiert. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit dem monoklonalen Mausantikörper H1 und mit dem Kaninchenserum #976 in einer 1:100 Verdünnung. Als Sekundärantikörper wurden verwendet: Ziege-anti-Maus ALEXA488 und Ziege-anti-Kaninchen ALEXA488. Zusätzlich wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Vergrößerung: 1000-fach.

In der zuvor durchgeführten Immunfluoreszenz-Analyse war zu erkennen, dass das Kaninchenserum #976 das gleiche cytoplasmatische Lokalisationsmuster für KIF5C zeigte wie der Mausantikörper H1. Es musste jedoch auch in der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass das Fluoreszenzsignal durch die steigende Zugabe an komplementärem Peptid kompetitierbar ist. SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und permeabilisiert. Das Serum #976 wurde mit steigenden Mengen (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) des neutralisierenden Peptids vorinkubiert und anschließend einer Immunfluoreszenz-Studie unterzogen. Zusätzlich wurde eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Eine Aufnahme im Hellfeld diente der morphologischen Detektion der SH-SY5Y Zellen. In Abbildung 12 erkennt man, dass steigende Mengen an zugegebenem Peptid 976 zu einer Abschwächung (10  $\mu$ M) bzw. einem Verlust (20  $\mu$ M) des cytoplasmatischen Signals in der Immunfluoreszenz führen. Durch die zusätzliche Überlagerung der Fluoreszenz- mit der Hellfeld-Aufnahme kann verdeutlicht werden, dass die Zellen nur noch das DAPI-Signal aufweisen. Somit kann gezeigt werden, dass das hergestellte Kaninchenserum #976 spezifisch gegen KIF5C gerichtet und für alle im Folgenden durchgeführten Experimente geeignet ist.

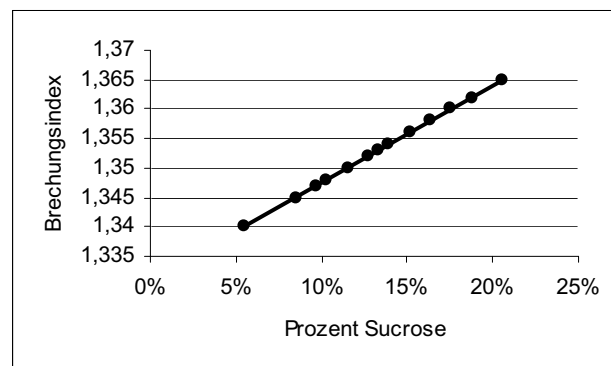


**Abbildung 12:** Kompetitionsstudie mit steigenden Mengen Peptid 976 in SH-SY5Y Zellen.

SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit 3.75% Formaldehyd fixiert und mit 0.5% Triton X-100 permeabilisiert. Das Serum #976 wurde mit steigenden Mengen des Peptids 976 (0 - 20  $\mu$ M) vorinkubiert und 1 h mit SH-SY5Y Zellen inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziegenanti-Kaninchen ALEXA488-Antikörper verwendet. Zusätzlich wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Linke Seite: Überlagerung der KIF5C- und DAPI-Fluoreszenz. Rechte Seite: Überlagerung der Fluoreszenzen mit dem Hellfeld. Vergrößerung: 1000-fach.

### 6.6 Die Untereinheiten der Proteinkinase CK2 sedimentieren im Sucroседichte-gradient in den gleichen Fraktionen wie KIF5C

Nach der Identifikation von SH-SY5Y als eine für KIF5C und CK2 positive Zelllinie, wurde eine Sucroседichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt, um die Verteilung von KIF5C und der Proteinkinase CK2 im Cytoplasma genauer zu untersuchen. Hierzu wurde das Protokoll von Rahman *et al.*, 1999 in leicht abgeänderter Form verwendet. SH-SY5Y Zellen wurden geerntet und das Cytoplasma extrahiert. Dieser Cytoplasmaextrakt wurde auf einen linearen 5 - 20% Sucroседegradiеnten geladen und bei 4°C in der Ultrazentrifuge bei 288000xg für 16 Stunden zentrifugiert. Am folgenden Tag wurden die Zentrifugenröhrchen mittels einer Kanüle am Boden durchstoßen und der Inhalt in 1 ml Fraktionen in Reaktionsgefäße getropft. Es wurden 50 µl der einzelnen Fraktionen sofort zur Bestimmung des Brechungsindex mit einem Refraktometer verwendet. Die Brechungsindices wurden mit Hilfe einer Eichgeraden bestehend aus vier Kontroll-Sucroселösungen (5%, 10%, 15%, 20%) ermittelt. Mittels der Auswertung durch Microsoft Excel konnte so jeder Fraktion eine spezifische Sucroселkonzentration zugeordnet und die Linearität des Gradienten bestätigt werden (Abb. 13).

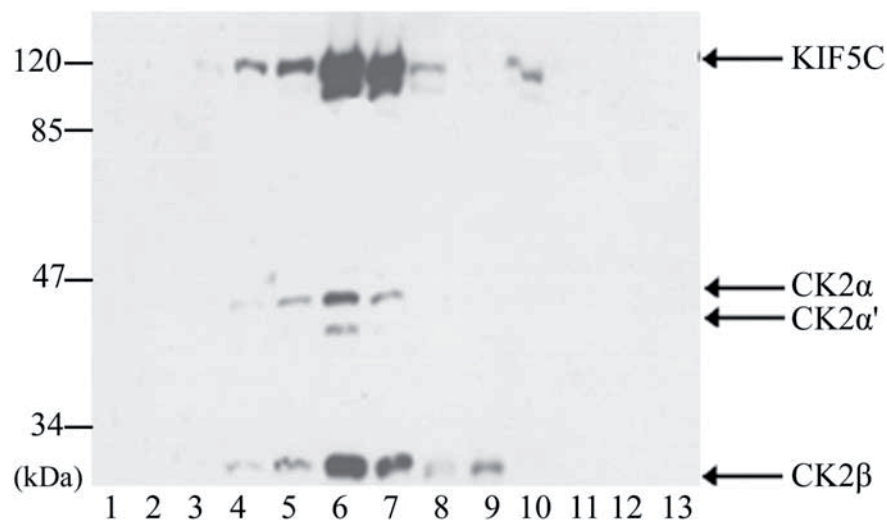


**Abbildung 13:** Überprüfung des 5 - 20% Sucroседichtegradienten auf Linearität.

Der Brechungsindex von je 50 µl der einzelnen Fraktionen wurden im Refraktometer bestimmt und mit Hilfe einer Eichgeraden von 4 Kontrollverdünnungen der Sucroселösung (5%, 10%, 15%, 20%) graphisch ausgewertet.

Nachdem die Linearität des Gradienten bestätigt war, wurde die Hälfte der Fraktionen mit eiskaltem Aceton gefällt, mit Methanol gewaschen und abschließend in SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Fraktionen wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Der Nachweis der katalytischen CK2-Untereinheiten und der

regulatorischen CK2-Untereinheit erfolgte mit den Mausantikörpern 1AD9 und 6D5. KIF5C wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper H1 detektiert. In Abbildung 14 erkennt man KIF5C in den Fraktionen 4 - 8. Die CK2 $\beta$ -Untereinheit sedimentiert in den Fraktionen 4 - 10, wobei eine deutlich größere Proteinmenge in den Fraktionen 6 - 7 detektiert werden kann. Der Nachweis der beiden katalytischen Untereinheiten erfolgt bei der CK2 $\alpha$ -Untereinheit von Fraktion 4 - 7, bei der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit in Fraktion 6. Aus der Kosedimentation von KIF5C mit der Proteinkinase CK2, lässt sich der Schluss einer möglichen Assoziation ziehen.



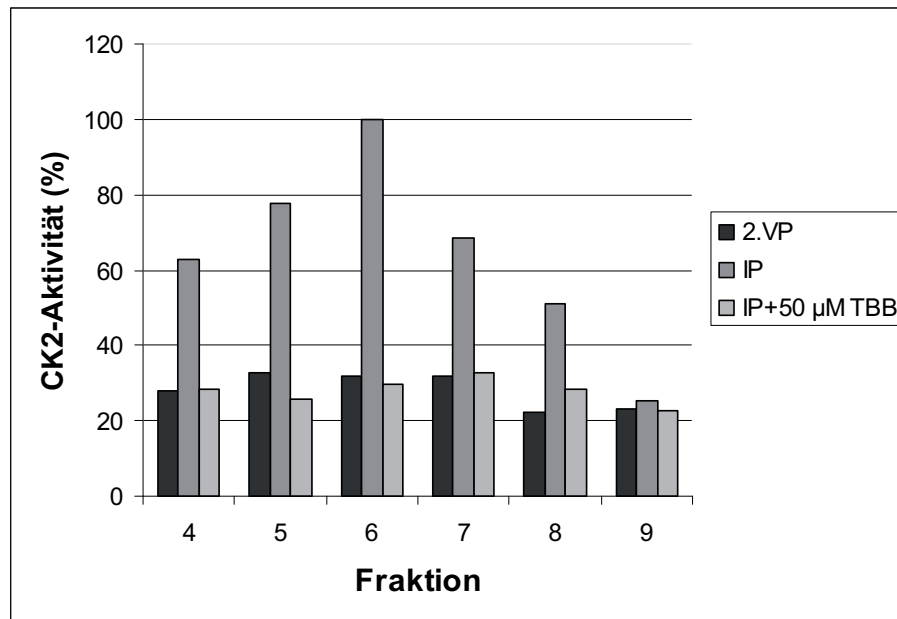
**Abbildung 14:** Kosedimentations-Analyse von KIF5C und den einzelnen CK2-Untereinheiten.

Es wurden 2 mg SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakt auf einen 5 - 20% linearen Sucrosegradient geladen und 16 h bei 288000xg und 4°C zentrifugiert. Durch kontinuierliches Austropfen vom Boden des Gradienten wurden 13 Fraktionen zu 1 ml gewonnen. Ein Aliquot von 500  $\mu$ l wurde mit Aceton gefällt, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von KIF5C erfolgte mit dem Mausantikörper H1. Die katalytischen CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ - Untereinheiten wurden mit dem Mausantikörper 1AD9, die CK2 $\beta$ -Untereinheit mit dem Mausantikörper 6D5 nachgewiesen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers und der ECL-Methode. Die Molekulargewichte des „prestained“-Molekulargewichtsmarkern von Fermentas sind links in der Abbildung angegeben.

### **6.7 Die Fraktionen des Sucrosegradienten, in denen KIF5C und die Untereinheiten der Proteinkinase CK2 kosedimentieren, enthalten eine Kinaseaktivität**

Der vorangegangene Versuch zeigte, dass KIF5C mit der CK2 in einem Sucrosegradienten in den gleichen Fraktionen kosedimentierte. Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob sich in den Fraktionen der Kosedimentation eine Kinaseaktivität detektieren lässt. Aus diesem Grund wurde die verbliebene Hälfte der Sucrosegradient-Fraktionen 4 bis 9, welche KIF5C und CK2 enthielten, einer Koimmunpräzipitations-Analyse und einer anschließenden Kinasereaktion mit dem CK2-spezifischen Substratpeptid RRRDDDSDDD (Kuenzel & Krebs, 1985) unterzogen. Hierzu wurden die einzelnen Fraktionen mit Protein A-Sepharose vorpräzipitiert und mittels des Kaninchenserums #976 und Protein A-Sepharose präzipitiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Immunpräzipitate geteilt: eine Hälfte wurde mit dem CK2-spezifischen Inhibitor TBB (Sarno *et al.*, 2001) behandelt und die andere Hälfte wurde nicht behandelt. Auch die Vorpräzipitate wurden geteilt, jedoch wurde hier eine Hälfte verworfen. Sämtliche Präzipitate wurden danach in einer *in vitro* Kinasereaktion untersucht. Die CK2-Aktivität wurde im Szintillationsgerät durch die Phosphorylierung des Substratpeptids bestimmt. Bei der graphischen Auswertung mittels Microsoft Excel wurde die CK2-Aktivität des Immunpräzipitats aus Fraktion 6 auf 100% gesetzt, da hier zuvor die größten Proteinmengen kosedimentiert waren. Man erkennt in Abbildung 15, dass die Aktivität der Kinase am Immunkomplex von Fraktion 4 bis zu Fraktion 6 des Sucroседichtegradienten deutlich ansteigt, um anschließend von 100% in Fraktion 6 auf nur noch 25% in Fraktion 9 abzufallen. Die Vorpräzipitate zeigen nur eine Aktivität zwischen 20 und 40%. Man sieht weiterhin, dass die gemessene CK2-Aktivität an den Immunpräzipitaten durch die Zugabe von 50 µM TBB auf die Höhe der Aktivität der Vorpräzipitate sinkt. Diese Aktivitätszunahme bzw. -abnahme korreliert mit den zuvor im Sucrosegradienten detektierten Proteinmengen. Somit lässt sich am Immunpräzipitat von KIF5C eine CK2-spezifische Aktivität messen. Dieses Ergebnis lässt auf eine mögliche Assoziation von KIF5C und der Proteinkinase CK2 schließen.





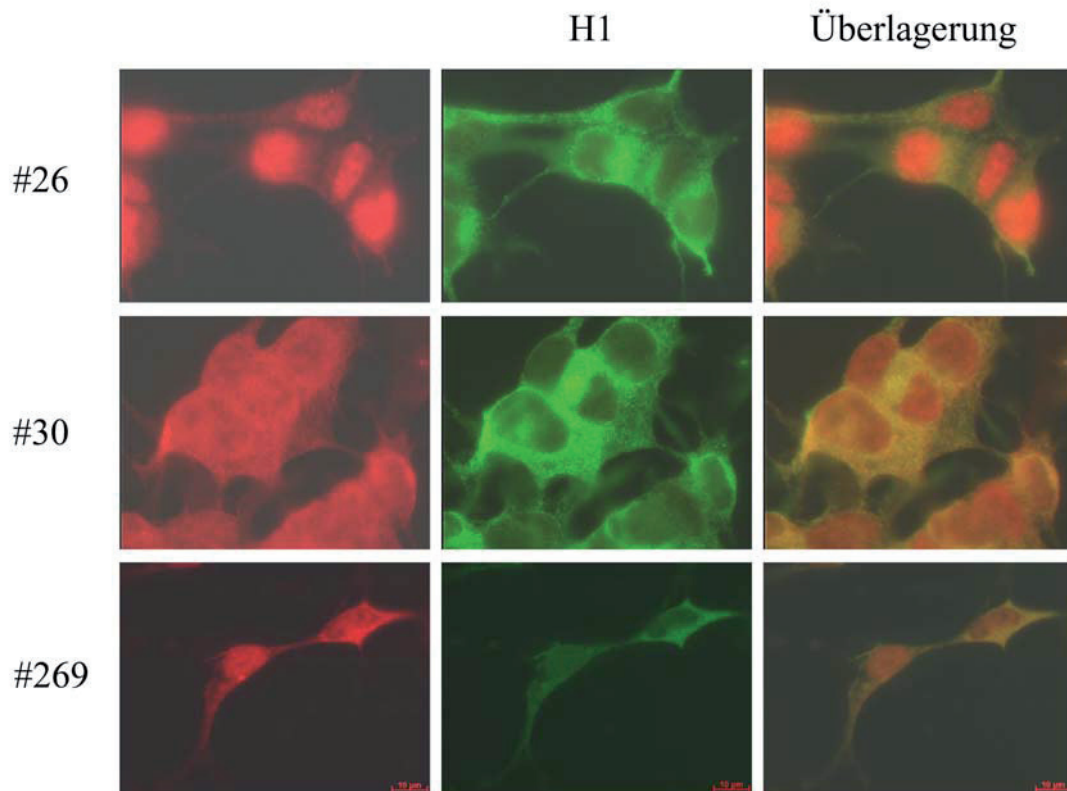
**Abbildung 15:** Kinaseaktivitäts-Untersuchungen am Immunpräzipitat der Sucroседichtegradient-Fraktionen 4 bis 9.

Die verbliebenen 500 µl der Fraktionen 4 - 9 des Sucroседichtegradienten wurden mit Protein A-Sepharose vor- und danach mit Serum #976 und Protein A-Sepharose immunpräzipitiert. Der Immunkomplex wurde geteilt, ein Ansatz blieb unbehandelt, ein Ansatz wurde zusätzlich mit 50 µM TBB behandelt und beide Ansätze, sowie 50% der 2.Vorpräzipitate in einem Phosphorylierungsassay mit dem synthetischen CK-Substratpeptid untersucht. Die graphische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel. Die CK2-Aktivität des Immunpräzipitats von Fraktion 6 wurde auf 100% gesetzt.

### 6.8 KIF5C ist mit der Proteinkinase CK2 in SH-SY5Y Zellen kolokalisiert

Durch die Analyse des Sucroседichtegradienten konnte bereits gezeigt werden, dass KIF5C mit sämtlichen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 kosedimentierte und dass ein Immunpräzipitat der Fraktionen der Kosedimentation eine CK2-Kinaseaktivität messbar war. Zusätzlich wurde in einer Veröffentlichung von Faust *et al.*, 1999 gezeigt, dass die katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 spezifisch an das cytoskeletale Protein Tubulin binden. Da die Kinesin-Motorproteine Mikrotubuli als Schienen für den Transport von Proteinen und Vesikeln nutzen (Vallee & Sheptner, 1990), wurde im Folgenden eine mögliche Kolokalisation zwischen KIF5C und den einzelnen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 untersucht. Diese Untersuchung wurde mit einer Doppelimmunfluoreszenz-Analyse durchgeführt, bei der man beide Antikörper von Interesse mit den ausgesäten Zellen inkubiert.

Es muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Primär- und fluoreszierenden Sekundärantikörper aus unterschiedlichen Spezies gewonnen wurden, um eine spezifische Fluoreszenz zu gewährleisten. Zusätzlich müssen die sekundären Fluoreszenzantikörper so gewählt werden, dass sie im Emissionsspektrum weit genug auseinander liegen um Fluoreszenzüberlagerungen auszuschließen. Durch eine manuelle Überlagerung der Fluoreszenzen können Rückschlüsse auf mögliche Kollokalisierungen gezogen werden. Die Doppelimmunfluoreszenz-Analysen wurden in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y durchgeführt. Als primärer Antikörper gegen KIF5C diente der Mausantikörper H1, bei den Antikörpern gegen die CK2-Untereinheiten wurden die Kaninchenserum #26 (gegen CK2 $\alpha$ ), #30 (gegen CK2 $\alpha'$ ) und #269 (gegen CK2 $\beta$ ) verwendet. Als sekundäre Antikörper dienten ein Ziege-anti-Maus ALEXA488- und ein Ziege-anti-Kaninchen ALEXA594-Fluoreszenzantikörper. In Abbildung 16 sieht man, dass die CK2 $\alpha$ -Untereinheit eine nukleäre Lokalisation zeigt, wohingegen sich das Fluoreszenzsignal der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit in der gesamten Zelle verteilt. Auch CK2 $\beta$  kann sowohl im Cytoplasma als auch im Kern von SH-SY5Y Zellen detektiert werden. Das Motorprotein KIF5C zeigt in sämtlichen Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen ein cytoplasmatisches Verteilungsmuster. Durch die Überlagerung der Fluoreszenzen kann gezeigt werden, dass KIF5C mit allen CK2-Untereinheiten im Cytoplasma von SH-SY5Y Zellen kollokalisiert ist. Die Kollokalisierung von KIF5C mit CK2 $\alpha$  ist durch die größtenteils nukleäre Verteilung dieser CK2-Untereinheit im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Untereinheiten am schwächsten ausgeprägt.



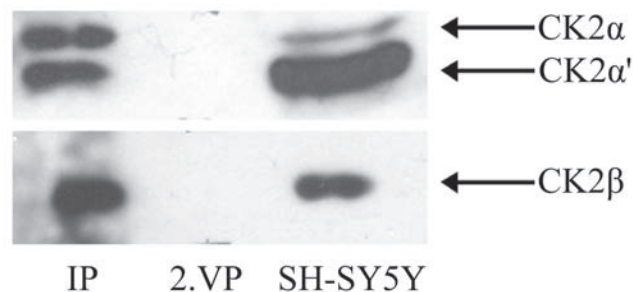
**Abbildung 16:** Kolokalisations-Analyse von KIF5C und den CK2-Untereinheiten an SH-SY5Y Zellen.

SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am Folgetag mit 3.7% Formaldehyd fixiert. Nach der Permeabilisierung mit 0.5% Triton X-100 wurden die Zellen mit dem Antikörper H1 gegen KIF5C und den CK2 Kaninchenseren #26 (CK2 $\alpha$ ), #30 (CK2 $\alpha'$ ) und #269 (CK2 $\beta$ ) für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten ein Ziege-anti-Maus ALEXA488- und ein Ziege-anti-Kaninchen ALEXA594-Antikörper. Vergrößerung: 1000-fach.

## 6.9 KIF5C kann mit der Proteinkinase CK2 *in vivo* kopräzipitiert werden

Zwar konnte bereits eine Kosedimentation, eine Kinaseaktivität am Immunpräzipitat von KIF5C und eine Kolokalisation von KIF5C mit der Proteinkinase CK2 gezeigt werden, doch konnten diese Untersuchungen nur einen ersten Aufschluss über eine mögliche Proteininteraktion geben. Durch die Sedimentationsanalyse konnte nur das Vorliegen von KIF5C und der Proteinkinase CK2 im Cytoplasma von SH-SY5Y Zellen bestätigt werden. Auch durch die Aktivitätsuntersuchung der Fraktionen konnte keine Aussage zu einer Bindung einzelner CK2-Untereinheiten an KIF5C getroffen werden. In der Immunfluoreszenz kann es möglich sein, dass sich die Proteine in unterschiedlichen Ebenen innerhalb einer Zelle

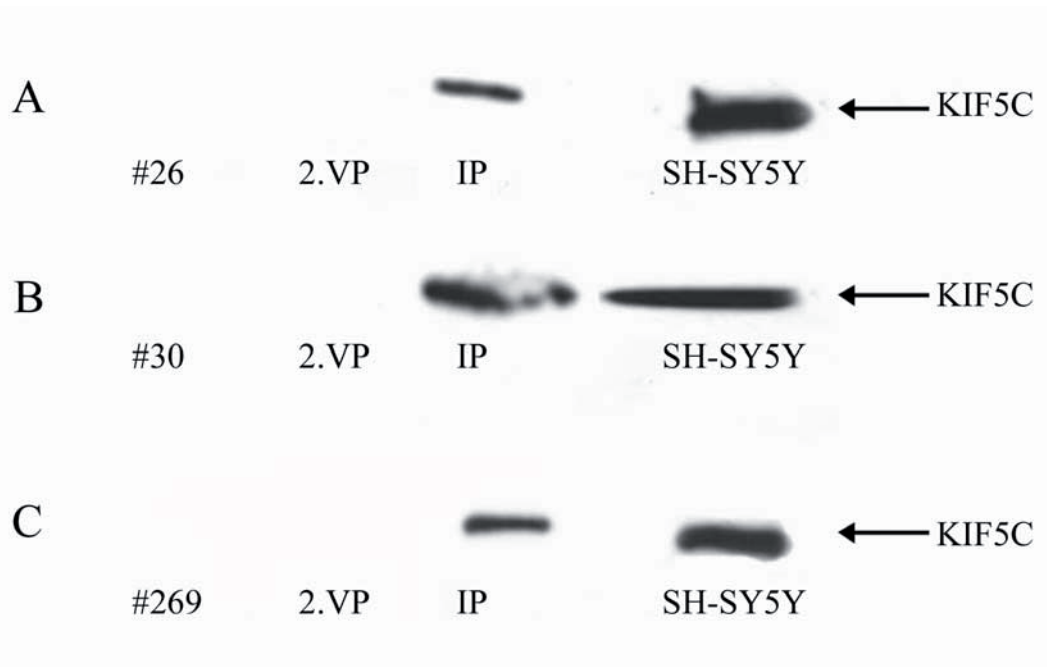
befinden, dies jedoch durch die Überlagerung der Fluoreszenzen nicht zu erkennen ist. Zur Untersuchung einer Assoziation von KIF5C mit der Proteinkinase CK2 wurden daher erneut Koimmunpräzitations-Analysen durchgeführt. Da Kinesine cytoplasmatische Proteine sind, wurde ein Cytoplasmaextrakt mit dem KIF5C spezifischen Serum #976 inkubiert. Als Kontrollen dienten das Vorpräzipitat, bestehend aus Protein A-Sepharose inkubiert mit dem Cytoplasmaextrakt und ein SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakt zur Detektion der CK2-Untereinheiten. Vor- und Immunpräzipitate wurden identisch gewaschen, eluiert und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der einzelnen CK2-Untereinheiten erfolgte mit den Mausantikörpern 1AD9 (gegen CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$ ) und 6D5 (gegen CK2 $\beta$ ). Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, können beide katalytischen Untereinheiten und die regulatorische Untereinheit nur im Immunpräzipitat (IP) und dem Cytoplasmaextrakt, nicht jedoch im 2. Vorpräzipitat (2.VP) detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass KIF5C mit sämtlichen CK2-Untereinheiten aus SH-SY5Y Zellen präzipitiert werden kann, was auf eine Assoziation von KIF5C mit der CK2 hindeutet. Des Weiteren ist im Cytoplasmaextrakt von SH-SY5Y Zellen eine deutlich geringere Expression von CK2 $\alpha$  im Vergleich zu CK2 $\alpha'$  und CK2 $\beta$  zu beobachten.



**Abbildung 17:** Koimmunpräzitations-Analyse von KIF5C und der Proteinkinase CK2.

Ein Gemisch aus Protein A-/CL4B-Sepharose wurde mit 1.5 mg SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakt vorpräzipitiert und anschließend mit Protein A-/CL4B-Sepharose und dem Kaninchenserum #976 immunpräzipitiert. Die Vor- und Immunpräzipitate wurden gewaschen und zusammen mit 250  $\mu$ g Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der katalytischen CK2-Untereinheiten erfolgte mit dem Antikörper 1AD9, der Nachweis der CK2 $\beta$ -Untereinheit erfolgte mit Antikörper 6D5. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper und ECL-Methode. IP: Immunpräzipitat, 2.VP: 2. Vorpräzipitat.

Zur Unterstützung der erhaltenen Ergebnisse wurde die Koimmunpräzipitation auch in umgekehrter Richtung durchgeführt. Das bedeutet, dass die einzelnen CK2-Untereinheiten mittels ihrer Kaninchenseren #26 (CK2 $\alpha$ ), #30 (CK2 $\alpha'$ ) und #269 (CK2 $\beta$ ) aus dem Cytoplasmaextrakt von SH-SY5Y Zellen präzipitiert wurden, um KIF5C am Immunpräzipitat nachzuweisen. Als Kontrollen dienten die einzelnen Seren, die Vorpräzipitate und ein SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakt. Der Nachweis von KIF5C in der Westernblot-Analyse erfolgte mit dem Mausantikörper H1. In Abbildung 18 A-C sieht man, dass KIF5C weder in den Antikörperkontrollen noch in den Vorpräzipitaten detektiert werden kann. Ein Nachweis von KIF5C ist nur im Cytoplasmaextrakt und den einzelnen Immunpräzipitaten möglich. Somit bestätigt sich das zuvor erhaltene Ergebnis, dass KIF5C *in vivo* mit sämtlichen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 kopräzipitiert werden kann.



**Abbildung 18:** Koimmunpräzipitations-Analyse von KIF5C mit den CK2-Untereinheiten.

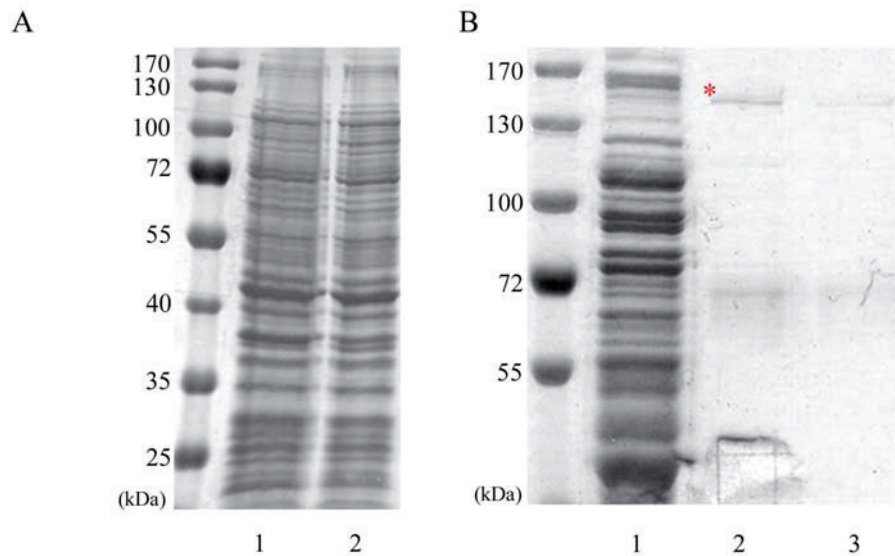
Ein SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakt (1.5 mg) wurde mit einem Gemisch aus Protein A-/CL4B-Sepharose inkubiert (Vorpräzipitat) und anschließend mit Protein A-/CL4B-Sepharose und den verschiedenen Kaninchenseren gegen die individuellen CK2-Untereinheiten. Die Vor- und Immunpräzipitate wurden gewaschen und zusammen mit 250  $\mu$ g Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. KIF5C wurde mit dem spezifischen Mausantikörper H1 detektiert. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper und ECL-Methode. **A:** Koimmunpräzipitation mit dem CK2 $\alpha$ -Serum #26, **B:** Koimmunpräzipitation mit dem CK2 $\alpha'$ -Serum #30, **C:** Koimmunpräzipitation mit dem CK2 $\beta$ -Serum #269. #26, #30, #269: Antikörperkontrolle, 2.VP: 2. Vorpräzipitat, IP: Immunpräzipitat.

## 6.10 *In vitro* Bindungsstudien mit KIF5C und Proteinkinase CK2

Im vorangegangenen Versuch konnte gezeigt werden, dass KIF5C *in vivo* mit der Proteinkinase CK2 kopräzipitierte. Nun stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um eine direkte Assoziation handelte. Es könnte sein, dass die Proteine eines Immunpräzipitats Teile eines Komplexes sind, ohne eine direkte Bindung zueinander zu besitzen. Zur genaueren Untersuchung einer möglichen Bindung und um die im Hefe-Zwei-Hybrid-System erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde in weiterführenden Analysen auch die Assoziation der einzelnen Proteine *in vitro* untersucht.

### 6.10.1 Herstellung der benötigten DNA-Konstrukte, Proteinexpression und Reinigung

Zur Untersuchung einer *in vitro* Assoziation von KIF5C und der Proteinkinase CK2 wurde eine Koimmunpräzipitation mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Dazu wurde das Motorprotein KIF5C als bakteriell exprimiertes Volllängenprotein hergestellt und gereinigt. Hierzu wurde die DNA von KIF5C mittels PCR amplifiziert und über EcoRI-Restriktionsschnittstellen in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T1 einkloniert. Dieser Vektor kodiert für ein N-terminales „GST-tag“, welches die Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins erleichtern soll. Nach Überprüfung des hergestellten Konstrukts mittels Sequenzierung wurde das Plasmid in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Bei der Induktion wurde auf das Protokoll von Shimizu *et al.*, 2000 zurückgegriffen, bei dem die Proteinexpression mit 0.2 mM IPTG bei 25°C über Nacht induziert wurde. Wie in Abbildung 19 A zu erkennen ist, kann nach der Induktion keine deutliche KIF5C-Expression festgestellt werden. Auch nach einer Proteinreinigung (Abb. 19 B) können keine größeren Mengen an KIF5C-Protein gewonnen werden. Somit ist dieser Bakterienstamm für die Expression von KIF5C nur bedingt geeignet.

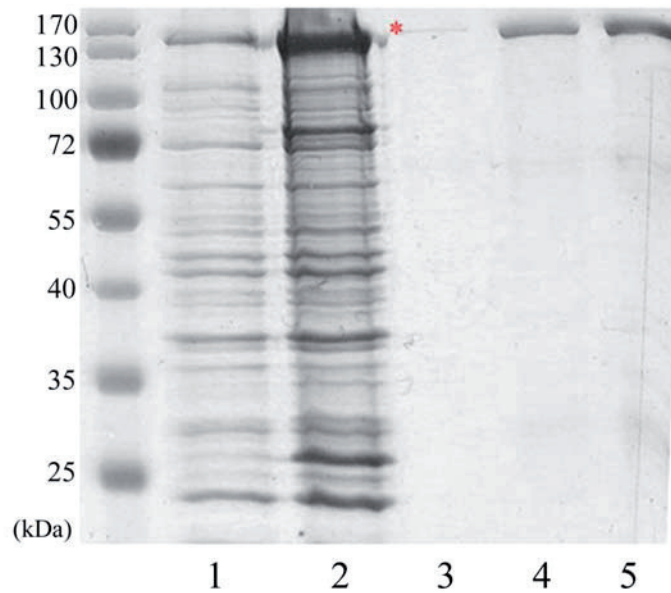


**Abbildung 19:** Induktion von transformierten BL21 (DE3) Bakterien und Proteinreinigung von GST-KIF5C.

**A:** BL21 Bakterien wurden mit dem Plasmid pGEX-4T1-KIF5C transformiert und mit 0.2 mM IPTG bei einer  $OD_{600nm} = 0.8$  über Nacht bei 25°C induziert. Es wurde je ein Aliquot der Bakterienkultur vor und nach der Induktion entnommen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinexpression wurde mittels Coomassie-Blau Färbung visualisiert. 1: transformierte BL21 vor der Induktion, 2: transformierte BL21 nach der Induktion. **B:** Die induzierten BL21 Bakterien wurden lysiert, GST-KIF5C-Hybridprotein an GSH-Sepharose gebunden und mit Glutathion eluiert. Die Eluate wurden über Nacht dialysiert, ein Aliquot von 10 µl entnommen und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinfärbung wurde mit Coomassie-Blau durchgeführt. 1: induzierte BL21, 2: Eluat 10 mM Glutathion, 3: Eluat 20 mM Glutathion. Ein \* kennzeichnet das KIF5C-Fusionsprotein. Die Molekulargewichte des „prestained“-Molekulargewichtsmarkern von Fermentas sind links in der Abbildung angegeben.

Da sich die Expression von KIF5C in *E. coli* BL21 (DE3) als so gering erwies, wurde im Folgenden der von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zimmermann zur Verfügung gestellte *E. coli* Bakterienstamm Rosetta verwendet. Nach der Transformation von pGEX-4T1-KIF5C wurde die Induktion der Bakterien nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zimmermann durchgeführt. In Abbildung 20 sieht man, dass eine deutliche KIF5C-Proteinexpression bei 37°C, 0.3 mM IPTG und nur drei Stunden Induktion detektiert werden kann (Spur 2). Auch wird nach der Reinigung eine hohe Proteinausbeute erreicht (Spur 3-5). Somit erweist sich der Rosetta-Stamm als bedeutend geeigneter als *E. coli* BL21(DE3) für die bakterielle Expression von KIF5C.





**Abbildung 20:** Induktion von transformierten Rosetta Bakterien und Proteinreinigung von GST-KIF5C.

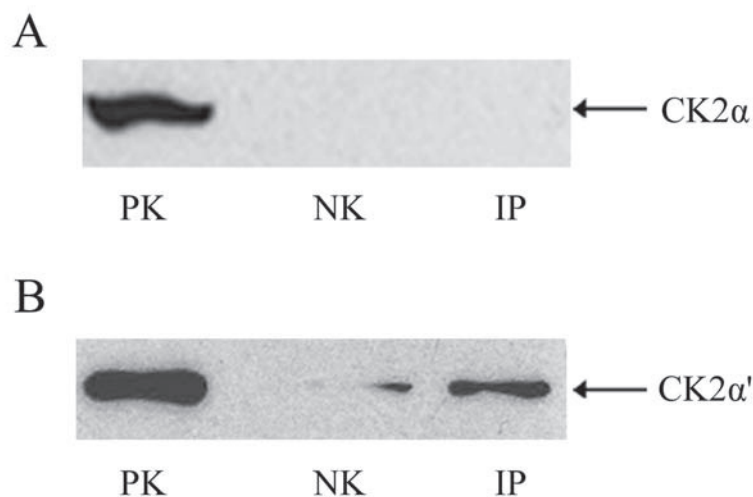
Rosetta Bakterien wurden mit dem Plasmid pGEX-4T1-KIF5C transformiert und mit 0.3 mM IPTG bei einer  $OD_{600nm}=1$  für 3 Stunden bei 37°C induziert. Die induzierten Bakterien wurden lysiert, an GSH-Sepharose gebunden und mit Glutathion eluiert. Die Eluate wurden über Nacht dialysiert. Es wurde je ein Aliquot der Bakterienkultur vor und nach der Induktion, sowie nach der Proteinreinigung entnommen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinexpression und -reinigung wurde mittels Coomassie-Blau Färbung visualisiert. 1: transformierte Rosetta vor der Induktion, 2: transformierte Rosetta nach der Induktion, 3: Eluat 10 mM Glutathion, 4: Eluat 20 mM Glutathion, 5 Eluat 30 mM Glutathion. Ein \* kennzeichnet GST-KIF5C. Die Molekulargewichte des „prestained“-Molekulargewichtsmarkers sind links in der Abbildung angegeben.

### 6.10.2 KIF5C kopräzipitiert *in vitro* nur mit CK2 $\alpha'$

Zur Untersuchung der *in vitro* Assoziation von KIF5C und der Proteinkinase CK2 wurde im Folgenden eine Koimmunpräzipitations-Analyse mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Hierzu wurde gereinigtes KIF5C an GSH-Sepharose gebunden und zusammen mit den bakteriell exprimierten und gereinigten CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten inkubiert. Als Negativkontrolle (NK) wurde in einem weiteren Ansatz GSH-Sepharose ohne KIF5C mit den katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 inkubiert, um eine unspezifische Bindung von CK2 $\alpha$  oder CK2 $\alpha'$  an die Sepharose auszuschließen. Beide Ansätze wurden mehrmals gewaschen, mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose eluiert und zusammen mit der



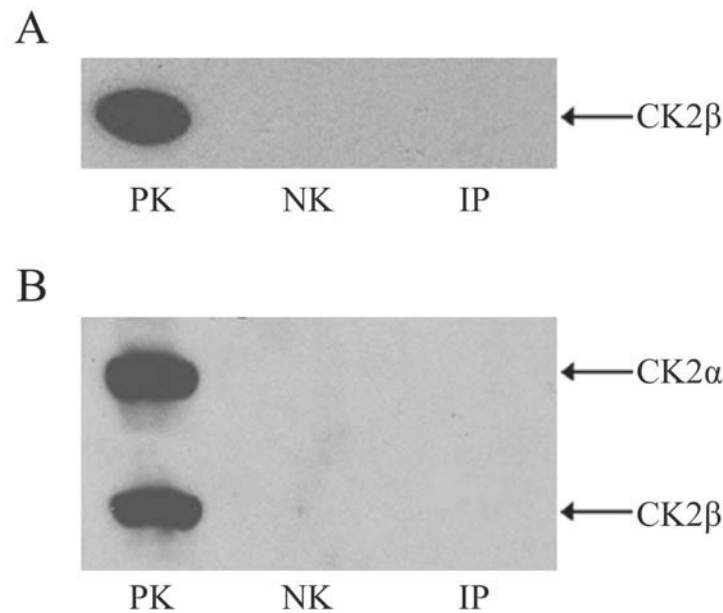
Positivkontrolle (PK), bestehend aus der eingesetzten Proteinmenge an CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$ , über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde gebundene CK2 $\alpha$  mit dem spezifischen Serum #26 und gebundene CK2 $\alpha'$  mit dem spezifischen Serum #30 detektiert. Vergleicht man in Abbildung 21 A die Positivkontrolle mit den beiden Präzipitaten, sieht man, dass CK2 $\alpha$  weder in der Negativkontrolle noch am Immunpräzipitat mit KIF5C detektierbar ist. Betrachtet man jedoch Abbildung 22 B, kann man feststellen, dass CK2 $\alpha'$  sowohl in der Negativkontrolle als auch am Immunpräzipitat nachweisbar ist. Beim Vergleich zwischen Negativkontrolle und Immunpräzipitat wird ersichtlich, dass eine deutlich größere Menge an CK2 $\alpha'$  an das Immunpräzipitat gebunden ist. Somit bindet KIF5C *in vitro* nur an CK2 $\alpha'$  und nicht an CK2 $\alpha$ .



**Abbildung 21:** Koimmunpräzipitations-Analysen von KIF5C mit CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$ .

Rekombinantes, gereinigtes KIF5C wurde an gewaschene GSH-Sepharose gebunden und mit den gereinigten Proteinen CK2 $\alpha$  bzw. CK2 $\alpha'$  inkubiert. Die Behandlung der Negativkontrollen erfolgte analog, jedoch ohne zuvor gebundenes KIF5C. Die mit Ripa-Puffer gewaschenen Immunkomplexe und Negativkontrollen wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert, über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Westernblot detektiert. Als Positivkontrolle dienten die gereinigten Proteine. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers und der ECL-Methode. **A:** Koimmunpräzipitation von KIF5C mit CK2 $\alpha$ . Als Nachweisantikörper wurde das Serum #26 verwendet. **B:** Koimmunpräzipitation von KIF5C mit CK2 $\alpha'$ . Als Nachweisantikörper wurde das Serum #30 verwendet. PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle, IP: Immunpräzipitat.

Zwar wurden bei der Untersuchung einer Proteininteraktion mit KIF5C im Hefe-Zwei-Hybrid-System nur die beiden katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 berücksichtigt, in der Untersuchung zu einer *in vitro* Bindung von gereinigten Proteinen sollten jedoch auch zusätzlich die regulatorische CK2 $\beta$ -Untereinheit, sowie das CK2-Holoenzym miteinbezogen werden. Es wurde auch hier rekombinantes KIF5C an GSH-Sepharose gebunden und entweder mit CK2 $\beta$  oder dem CK2-Holoenzym inkubiert. Die Negativkontrolle (NK) bestand aus GSH-Sepharose ohne KIF5C, inkubiert mit gereinigter CK2 $\beta$  oder gereinigtem CK2-Holoenzym, um auch hier eine unspezifische Bindung auszuschließen. Als Positivkontrolle (PK) wurde die gleiche Menge an eingesetzten CK2-Proteinen mitgeführt. Die Immunkomplexe, die Negativ- und die Positivkontrollen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung und Westernblot mit den spezifischen Seren gegen die CK2 $\beta$ -Untereinheit (#269) und CK2 $\alpha$ -Untereinheit (#26) dekoriert. In Abbildung 22 A wird durch den Vergleich mit der Positivkontrolle ersichtlich, dass die CK2 $\beta$ -Untereinheit *in vitro* weder an GSH-Sepharose (NK) noch an GSH-Sepharose mit vorinkubiertem KIF5C (IP) bindet. Auch das CK2-Holoenzym kann *in vitro* weder mit GSH-Sepharose mit noch mit GSH-Sepharose mit vorinkubiertem KIF5C assoziieren (Abb. 22 B). Betrachtet man sämtliche Ergebnisse dieses Versuches, kann man zusammenfassend feststellen, dass KIF5C *in vitro* nur an CK2 $\alpha'$ , nicht jedoch an CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$  oder das CK2-Holoenzym bindet.



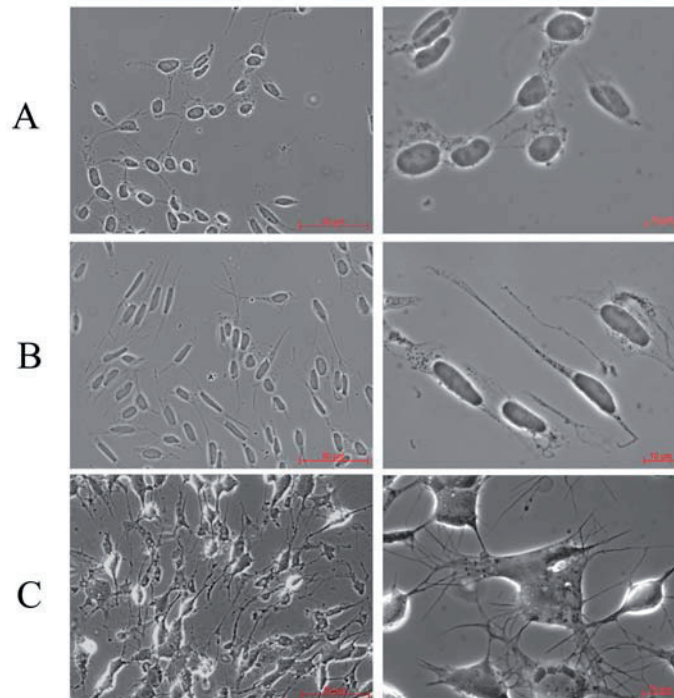
**Abbildung 22:** Koimmunpräzipitations-Analyse von KIF5C mit CK2β und dem CK2-Holoenzym.

Rekombinantes gereinigtes KIF5C wurde an gewaschene GSH-Sepharose gebunden und mit den gereinigten Proteinen CK2β bzw. CK2-Holoenzym inkubiert. Die Behandlung der Negativkontrollen ohne gebundenes KIF5C erfolgte analog. Die mit Ripa-Puffer gewaschenen Immunkomplexe wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels Westernblot detektiert. Als Positivkontrolle dienten die gereinigten Proteine. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers und der ECL-Methode. **A:** Koimmunpräzipitation von KIF5C mit CK2β. Als Nachweisantikörper wurde das Serum #269 verwendet. **B:** Koimmunpräzipitation von KIF5C mit CK2-Holoenzym. Als Nachweisantikörper wurden die Seren #26 und #269 verwendet. PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle, IP: Immunpräzipitat.

### 6.11 Eine Differenzierung von SH-SY5Y Zellen führt nicht zu einer Lokalisationsänderung der Proteinkinase CK2 oder von KIF5C

Die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y kann durch Zugabe von Retinsäure zu neuronartigen Zellen differenziert werden (König *et al.*, 1990). Hierzu wird Retinsäure in einer finalen Konzentration von 10 µM in das Kulturmedium gegeben und die Morphologieänderung der Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops überprüft. In Kultur gehalten, besitzen SH-SY5Y Zellen eine rundliche Gestalt (Abb. 23 A). Durch die Zugabe von Retinsäure beginnen die Zellen nach etwa 72 Stunden cytoplasmatische Ausläufer zu bilden, sich zu strecken und eine längliche Gestalt anzunehmen (Abb. 23 B). Nach 96 Stunden ist die ursprüngliche

Zellmorphologie soweit verändert, dass die einst runden Zellen eine amorphe Gestalt mit vielen cytoplasmatischen Verästelungen innehaben (Abb. 23 C).

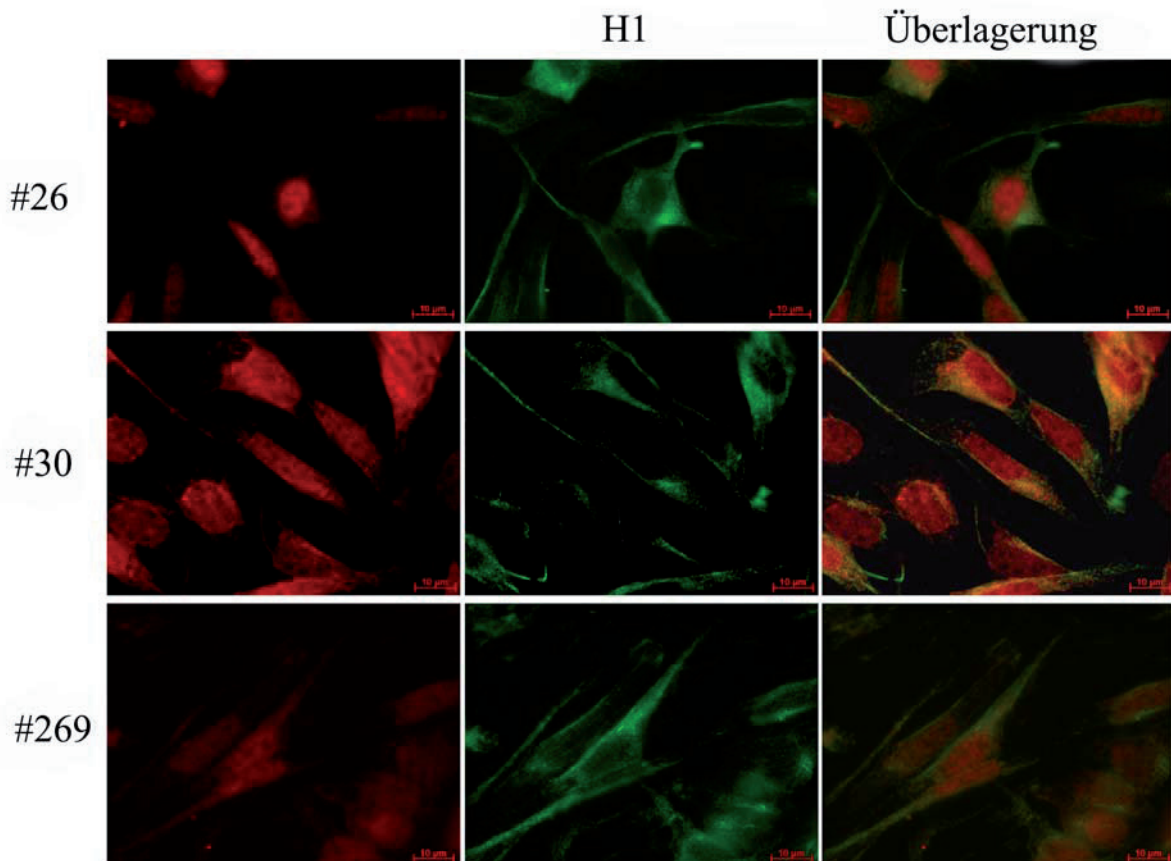


**Abbildung 23:** Differenzierung von SH-SY5Y Zellen durch die Zugabe von 10  $\mu$ M Retinsäure.

SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am Folgetag mit 10  $\mu$ M Retinsäure behandelt. Die Dokumentation der Morphologieänderung wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie durchgeführt. **A:** SH-SY5Y Zellen ohne Retinsäure, **B:** SH-SY5Y Zellen nach 72-stündiger Retinsäurebehandlung, **C:** SH-SY5Y Zellen nach 96-stündiger Retinsäurebehandlung. Linke Seite: Vergrößerung: 400-fach, rechte Seite: Vergrößerung: 1000-fach.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 10  $\mu$ M Retinsäure zu einer Differenzierung und somit zu einer morphologischen Veränderung von SH-SY5Y Zellen führte. Im Jahr 1992 wurde in einer Veröffentlichung von Diaz-Nido *et al.* gezeigt, dass eine Differenzierung von murinen Neuroblastomzellen zu einer Translokation der CK2 vom Kern ins Cytoplasma führte. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob sich die subzelluläre Lokalisation der einzelnen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 oder von KIF5C in differenzierten SH-SY5Y Zellen ändert. Hierzu wurden SH-SY5Y Zellen durch 72- bis 96-stündige Retinsäurezugabe differenziert und danach eine Doppelimmunfluoreszenz-Analyse mit den Kaninchenseren #26, #30 und #269 gegen die CK2-Untereinheiten sowie dem Mausantikörper H1 gegen KIF5C durchgeführt. In Abbildung 24 sieht man, dass eine induzierte Differenzierung von

SH-SY5Y Zellen durch Retinsäure nicht zu einer Lokalisationsänderung der einzelnen Proteine führt. CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$  sind größtenteils im Zellkern lokalisiert, CK2 $\alpha'$  zeigt eine über die ganze Zelle verteilte Lokalisation. Auch KIF5C behält sein cytoplasmatisches Verteilungsmuster bei. Eine Überlagerung der Fluoreszenzen zeigt, dass die Kolokalisation von KIF5C am stärksten bei der katalytischen CK2 $\alpha'$ -Untereinheit ausgeprägt ist, wohingegen nur eine geringe Kolokalisation mit der CK2 $\alpha$ - und CK2 $\beta$ -Untereinheit zu beobachten ist.

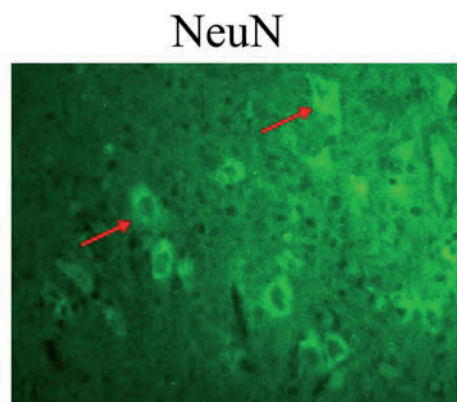


**Abbildung 24:** Kolokalisations-Untersuchung von KIF5C und der Proteinkinase CK2 in differenzierten SH-SY5Y Zellen.

SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am Folgetag mit 10  $\mu$ M Retinsäure behandelt. Nach 72 - 96 Stunden erfolgte die Fixierung mit 3.7% Formaldehyd und Permeabilisierung mit 0.5% Triton-X 100. Die Zellen wurden mit dem Antikörper H1 gegen KIF5C zusammen mit den CK2 Kaninchenseren #26 (CK2 $\alpha$ ), #30(CK2 $\alpha'$ ) und #269(CK2 $\beta$ ) inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten ein Ziege-anti-Maus ALEXA488- und Ziege-anti-Kaninchen ALEXA594-Antikörper. Spalte 1: CK2-Untereinheiten, Spalte 2: KIF5C, Spalte 3: Überlagerung der Fluoreszenzen. Vergrößerung: 1000-fach.

### 6.12 KIF5C und die Proteinkinase CK2 im Rückenmark

Bei dem Kinesin Heavy Chain Mitglied KIF5C handelt es sich um ein cytoplasmatisches Motorprotein, das vor allem in Motoneuronen verstärkt exprimiert wird (Kanai *et al.*, 2000). Daher sollte eine mögliche Kolo-kalisierung von KIF5C mit den CK2-Untereinheiten im Rückenmark zu betrachten. Dr. Oliver Wirths stellte freundlicherweise Rückenmark-Paraffin-Schnitte von Mäusen zu Verfügung, um die Lokalisation der Proteine zu überprüfen. Rückenmark-Schnitte wurden hierbei Gehirn-Schnitten vorgezogen, da es sich bei einem Grossteil der im Rückenmark verlaufenden Neurone um Motoneurone handelt. Da Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Geweben sehr oft einen hohen Hintergrund aufweisen, mussten die Neurone zuerst spezifisch gefärbt werden, um die neuronale Morphologie in späteren Untersuchungen zu detektieren. Diese Kontrollimmunfluoreszenzen wurden mit dem Neuron-spezifischen monoklonalen Mausantikörper NeuN von Chemicon durchgeführt. In Abbildung 25 ist durch die Pfeilmarkierung deutlich zu erkennen, dass die Neurone im Vergleich zum umliegenden Gewebe deutlich stärker gefärbt werden. Somit konnten die Neurone deutlich vom umliegenden Gewebe unterschieden werden.



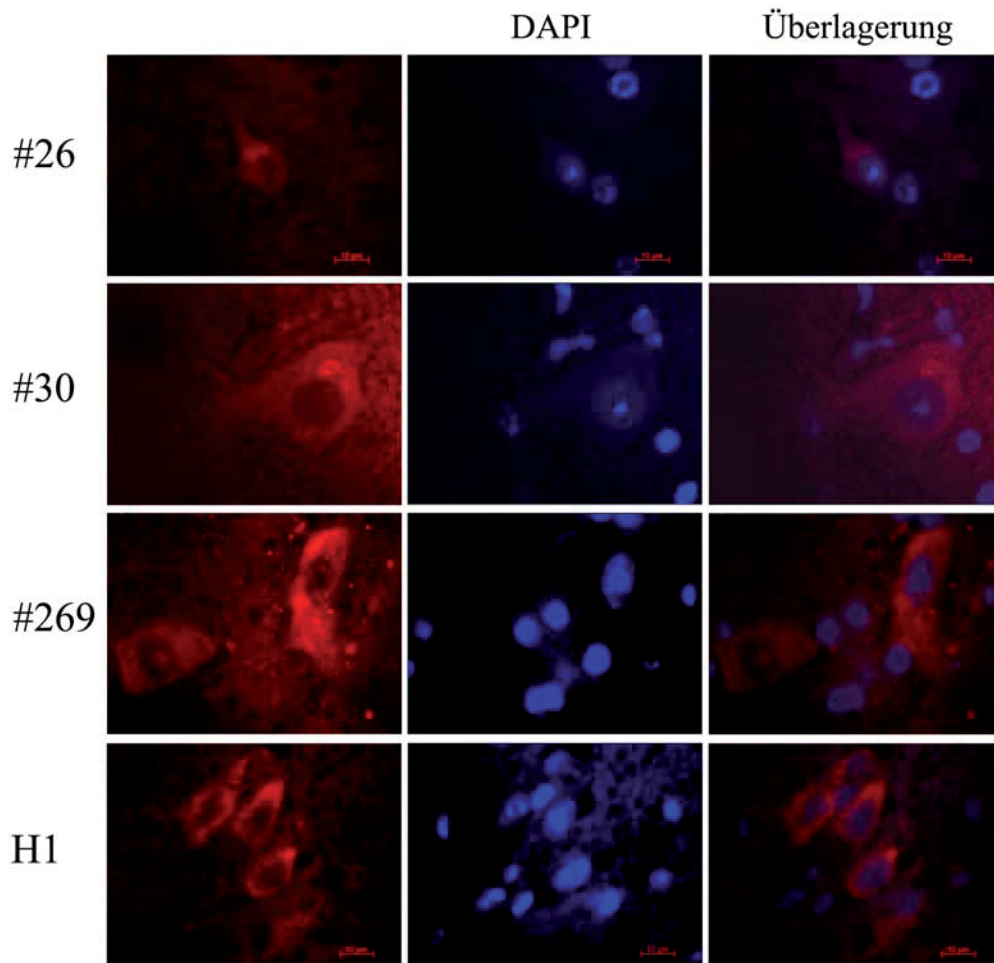
**Abbildung 25:** Identifikation von Neuronen an Rückenmark-Schnitten von Mäusen.

Paraffin-Rückenmark-Schnitte von Mäusen im Alter von 3 - 4 Monaten wurden mit Xylol deparaffiniert, 1 h mit 4% FCS und 10% Magermilch und dann über Nacht mit dem monoklonalen Mausantikörper NeuN (Verdünnung 1:100) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die 1-stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus ALEXA488. Nach erneutem Waschen wurde das auf einem Objektträger fixierte Rückenmark mit einem Deckglas verschlossen und einer Immunfluoreszenz-Untersuchung unterzogen. Die Pfeile markieren gefärbte Neurone. Vergrößerung 400-fach.

### 6.12.1 Die Lokalisierung der Proteinkinase CK2 und KIF5C im Rückenmark

Zur Untersuchung der Antikörper in Bezug auf ihre Eignung in der Immunfluoreszenz an Rückenmarks-Schnitten, wurden im Folgenden Einzelfärbungen mit den später zu verwendenden Antikörpern durchgeführt. Der monoklonale Mausantikörper H1 gegen KIF5C war bereits zuvor erfolgreich für die Immunfärbung an Gewebeschnitten getestet worden (Kanai *et al.*, 2000). Die Paraffin-Schnitte wurden einer Färbung mit den Kaninchenseren gegen beide katalytische Untereinheiten der Proteinkinase CK2 $\alpha$  (Serum #26), CK2 $\alpha'$  (Serum #30) und der regulatorischen CK2 $\beta$ -Untereinheit (Serum #269) auf einzelnen Präparationen unterzogen. An den Einzelfärbungen der Paraffin-Schnitte in Abbildung 26 ist ersichtlich, dass sämtliche Untereinheiten verstärkt im Cytoplasma der Neurone detektiert werden können. Diese cytoplasmatische Lokalisation wird durch die Überlagerung mit der zusätzlich durchgeführten DAPI-Färbung verdeutlicht. Zudem zeigt sich eine deutlich stärkere Rotfluoreszenz im Bereich der Neurone im Vergleich zum umliegenden Gewebe. Jedoch wird auch eine schwache Fluoreszenz im Bereich des Nukleus bei CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$  ersichtlich, welche bei der CK2 $\alpha'$  nicht zu erkennen ist. Bei der Untersuchung von KIF5C kann der cytoplasmatische Aufenthalt des Proteins bestätigt werden. Somit sind sämtliche untersuchten Antikörper für eine Färbung von Rückenmark-Schnitten geeignet.





**Abbildung 26:** Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von CK2 und KIF5C an Paraffin-Schnitten vom Mause Rückenmark

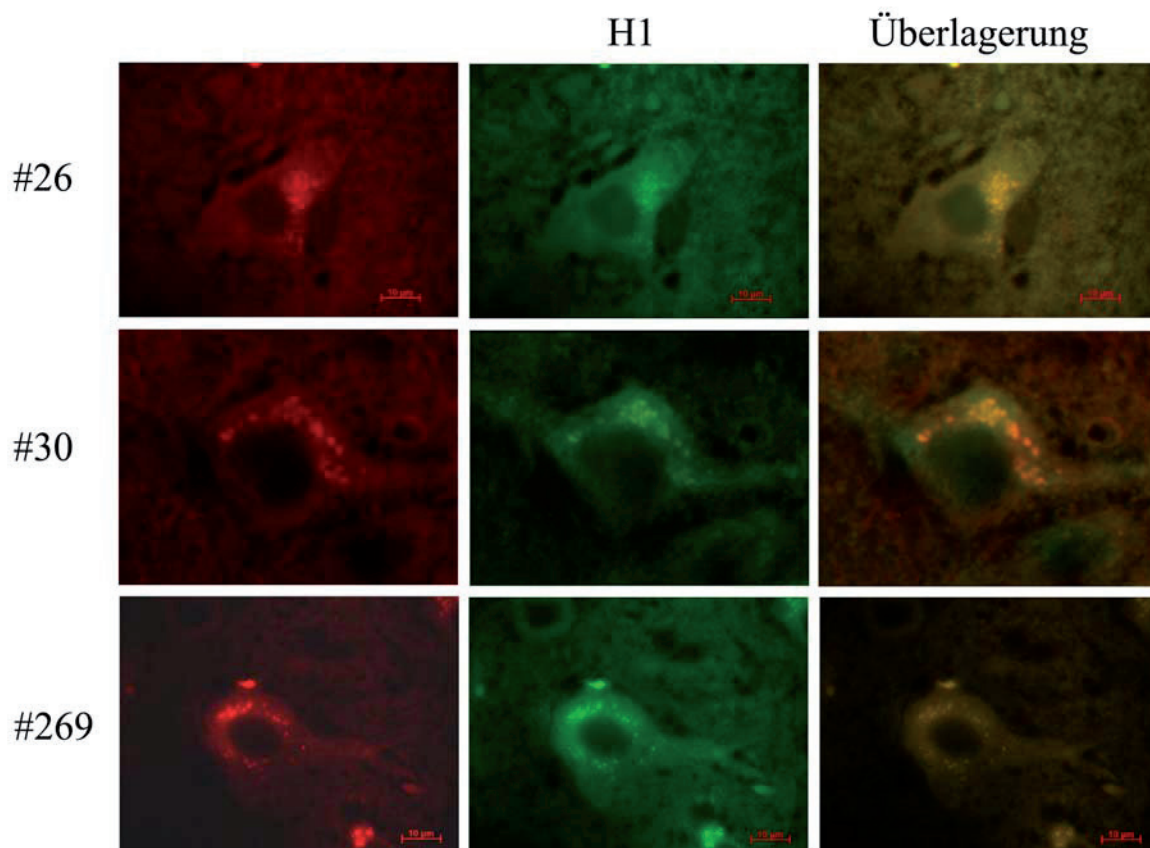
Rückenmark-Paraffin-Schnitte von Mäusen im Alter von 3 - 4 Monaten wurden mit Xylol deparaffiniert, 1 h mit 4% FCS und 10% Magermilch und dann über Nacht mit dem Mausantikörper H1 und den Kaninchenseren gegen die CK2-Untereinheiten (#26: CK2 $\alpha$ , #30: CK2 $\alpha'$ , #269: CK2 $\beta$ ) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Nach erneutem Waschen wurden die Gewebe 2 Minuten mit DAPI gefärbt, gewaschen und mit einem Deckglas fixiert. Vergrößerung: 1000-fach.

### 6.12.2 KIF5C ist im Rückenmark mit der Proteinkinase CK2 kolokalisiert

Nachdem sämtliche Kontrolluntersuchungen durchgeführt wurden, konnte das Rückenmark nun einer Doppelimmunfluoreszenz-Analyse unterzogen werden. Dabei wurden die Rückenmark-Schnitte über Nacht mit dem Mausantikörper H1 gegen KIF5C und den Kaninchenseren gegen die CK2-Untereinheiten (#26: CK2 $\alpha$ , #30: CK2 $\alpha'$ , #269: CK2 $\beta$ ) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe der beiden



fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Nach erneutem Waschen mit PBS, konnten die Gewebe mit einem Deckglas verschlossen und einer Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop unterzogen werden. In Abbildung 27 erkennt man, dass sämtliche CK2-Untereinheiten und das Motorprotein KIF5C verstärkt im Cytoplasma der Rückenmarksneuronen lokalisiert sind. Eine manuelle Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzen zeigt eine Kolo­kalisation von KIF5C sowohl mit den katalytischen als auch der regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2. Diese Kolo­kalisation zeigt sich verstärkt in intensiv fluoreszierenden Strukturen rund um den Zellkern der Neurone. Somit kolo­kalisiert das Motorprotein KIF5C mit der Proteinkinase CK2 im Cytoplasma von Motorneuronen.



**Abbildung 27:** Kolokalisations-Untersuchungen von KIF5C und der Proteinkinase CK2 an Paraffin-Rückenmarksschnitten von Mäusen.

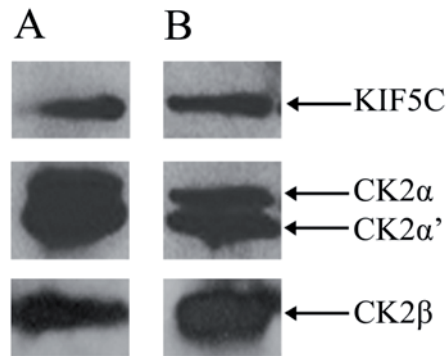
Paraffin-Schnitte von Mäusen wurden mit Xylol deparaffiniert, 1 h mit 4% FCS und 10% Magermilch und dann über Nacht mit dem Mausantikörper H1 und den CK2-Kaninchenseren (#26: CK2 $\alpha$ , #30: CK2 $\alpha'$ , #269: CK2 $\beta$ ) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe der fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus ALEXA488 und Ziege-anti-Kaninchen ALEXA594 für 1 Stunde. Nach erneutem Waschen wurden die Objektträger mit einem Deckglas fixiert. Vergrößerung: 1000-fach.

### **6.13 KIF5C und die Proteinkinase CK2 in Hippocampusneuronen**

Bei der Untersuchung zur Kolo­kalisierung von KIF5C und der Proteinkinase CK2 wurde in den vorangegangenen Versuchen die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y verwendet. Bei vielen in Kultur befindlichen Zellen zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede im Vergleich zu Primärzellen. So können sie beispielsweise durch transformierende Faktoren ein verändertes Wachstumsverhalten oder eine veränderte Proteinexpression aufweisen. Aus diesem Grund wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteinkinase CK2 und KIF5C in primären Hippocampusneuronen von Mäusen genauer untersucht.

#### **6.13.1 KIF5C und die Proteinkinase CK2 werden im Hippocampus von Mäusen exprimiert**

Vor der Durchführung von Immunfluoreszenz-Untersuchungen an primären Neuronen aus dem Hippocampus von Mäusen musste zuerst die Expression der einzelnen zu untersuchenden Proteine bestätigt werden. Hierzu wurde der Hippocampus von neugeborenen bzw. einen Tag alten Mäusen präpariert und das Cytoplasma extrahiert. Über ein SDS-Polyacrylamidgel wurden ein cytoplasmatischer Hippocampusextrakt zusammen mit einem Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen als Kontrolle aufgetrennt und in einer Westernblot-Analyse mit den Kaninchenseren anti-CK2 $\alpha$  (#26), anti-CK2 $\alpha'$  (#30), anti-CK2 $\beta$  (#269) und anti-KIF5C (#976) untersucht. Wie in Abbildung 28 zu erkennen, können sämtliche CK2-Untereinheiten sowie KIF5C im Cytoplasma des Hippocampus detektiert werden.

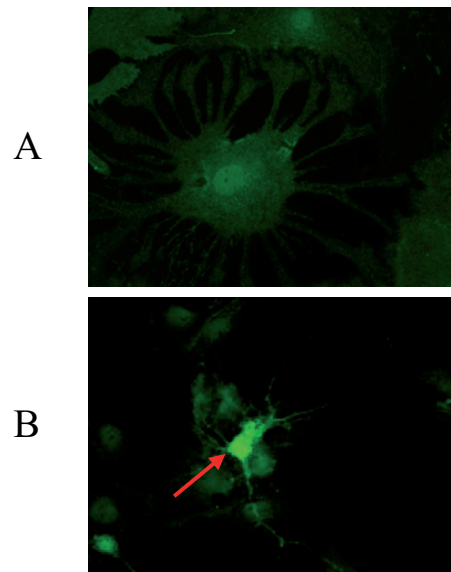


**Abbildung 28:** Detektion von KIF5C und der Proteinkinase CK2 im Hippocampus-Cytoplasmaextrakt von Mäusen.

Der Hippocampus von 3 Mäusen wurde präpariert, das Cytoplasma extrahiert und 100 µg des Extrakts über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle dienten 100 µg Cytoplasmaextrakt aus SH-SY5Y Zellen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der spezifischen Seren gegen die Untereinheiten der Proteinkinase CK2 (#26: CK2α, #30: CK2α', #269: CK2β) und Serum #976 gegen KIF5C. Die Visualisierung erfolgte mittels Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper und ECL-Methode. **A:** SH-SY5Y-Cytoplasmaextrakt, **B:** cytoplasmatischer Hippocampusextrakt.

### 6.13.2 Detektion von Neuronen

Da die Expression der CK2 und von KIF5C in der Westernblot-Analyse bestätigt werden konnte, wurden im Anschluss Immunfluoreszenz-Untersuchungen an primären Neuronen vom Maushippocampus durchgeführt. Die von R. Trautmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rettig (Fachrichtung Physiologie, Universität Homburg) präparierten Neurone wurden auf Deckgläschen kultivierten Astrocyten und Gliazellen ausgesät. Um eine spezifische Fluoreszenz der Neuronen untersuchen zu können, wurde vor der eigentlichen Kolokalisations-Untersuchung eine Markierung der Neuronen mit dem monoklonalen Mausantikörper NeuN und anschließender Fluoreszenzmarkierung mit Ziege-anti-Maus ALEXA488 durchgeführt. Dieser Antikörper eignet sich zur Detektion von Neuronen in der Immunfluoreszenz. In Abbildung 29 A sieht man die leichte Färbung einer Gliazelle. Im Gegensatz dazu kann man in Abbildung 29 B das deutlich stärkere Fluoreszenz-Signal des mit einem Pfeil markierten Neurons erkennen. Somit können die Neurone deutlich von den übrigen Zellen unterschieden werden.

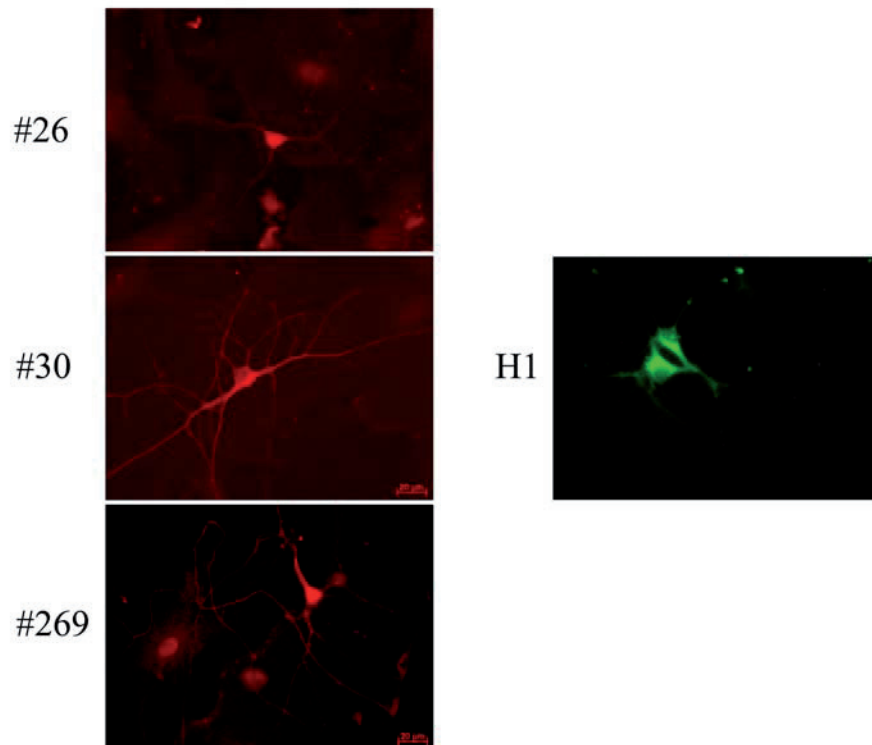


**Abbildung 29:** Immunfluoreszenz-Färbung von primären murinen Hippocampusneuronen.

Die auf Deckgläschen angezogenen Neurone wurden mit Methanol fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und 1 h mit dem Mausantikörper NeuN inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der Ziege-anti-Maus ALEXA488-Antikörper verwendet. **A:** Gliazelle, **B:** kultiviertes Neuron auf Astrocyten und Gliazellen. Der Pfeil markiert das gefärbte Neuron. Vergrößerung: 400-fach.

### 6.13.3 Lokalisations-Untersuchungen zu KIF5C und der Proteinkinase CK2 in Hippocampusneuronen

Nach der optischen Unterscheidung von primären Neuronen zu Astrocyten und Gliazellen konnte im Folgenden die Eignung der einzelnen Antikörper und die Lokalisation von KIF5C und den einzelnen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 untersucht werden. Hierzu wurde eine Einzelimmunfluoreszenz-Untersuchung mit den später einzusetzenden Antikörpern durchgeführt. In Abbildung 30 sieht man, dass die CK2 $\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2 in den primären Neuronen eine über den ganzen Zellkörper verteilte Lokalisation mit einer Konzentration im Nukleus aufweist. Im Gegensatz dazu kann im Kern der Neuronen keine CK2 $\alpha'$  detektiert werden, sondern nur im Cytoplasma. Bei der regulatorischen CK2 $\beta$ -Untereinheit kann das gleiche Lokalisationsmuster beobachtet werden wie bei der CK2 $\alpha$ -Untereinheit. Zudem erkennt man, dass alle CK2-Untereinheiten eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität in den Gliazellen aufweisen als in den Neuronen. KIF5C zeigt wie in allen vorangegangenen Immunfluoreszenz-Untersuchungen eine cytoplasmatische Lokalisation.

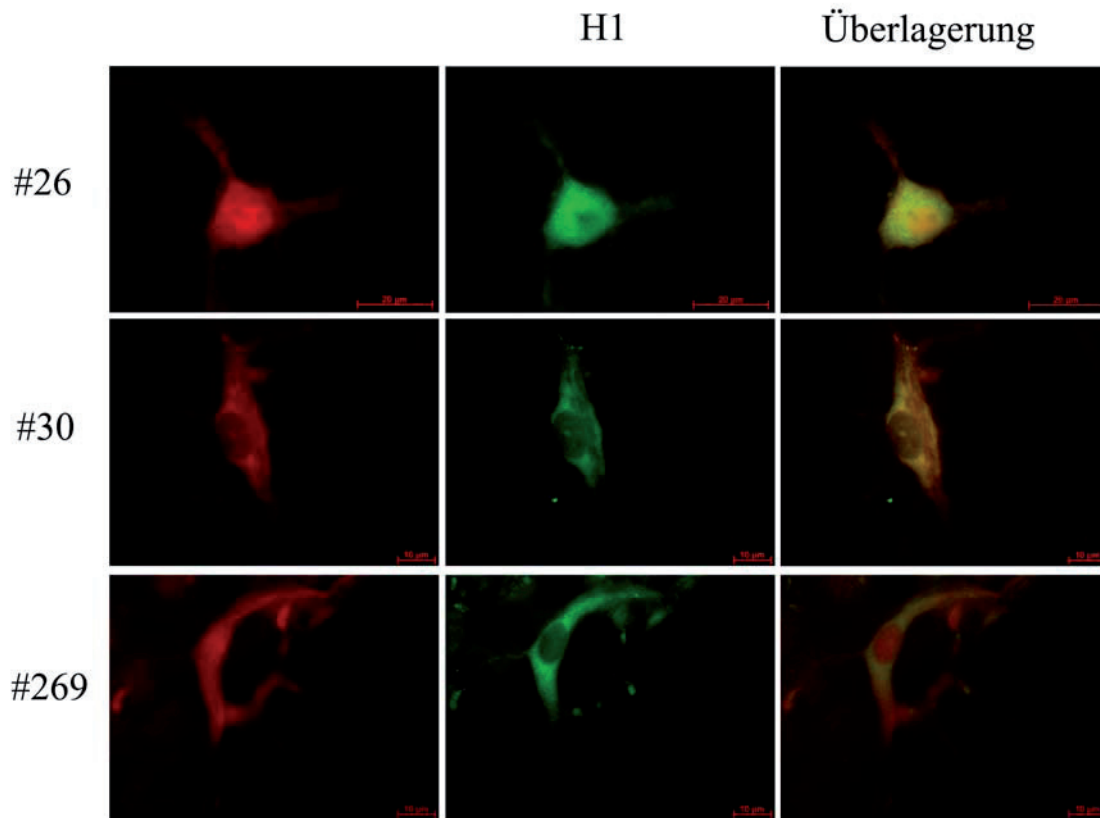


**Abbildung 30:** Lokalisations-Untersuchung von KIF5C und der Proteinkinase CK2.

Die Neurone wurden mit Methanol fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit dem Mausantikörper H1 und den verschiedenen Kaninchenseren gegen die CK2-Untereinheiten anti-CK2 $\alpha$  (#26), anti-CK2 $\alpha'$  (#30), anti-CK2 $\beta$  (#269) inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten ein Ziege-anti-Maus ALEXA488- und ein Ziege-anti-Kaninchen ALEXA594-Antikörper. Vergrößerung: 400-fach.

#### 6.13.4 KIF5C und die Proteinkinase CK2 sind in Hippocampusneuronen kolokalisiert

Durch die vorangegangenen Vorversuche konnte nun eine mögliche Kolokalisation von KIF5C mit der Proteinkinase CK2 untersucht werden. Hierzu wurde eine Doppelimmunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Die primären Hippocampusneurone wurden mit den spezifischen Kaninchenseren gegen die Untereinheiten der Proteinkinase CK2 (#26: CK2 $\alpha$ , #30: CK2 $\alpha'$ , #269: CK2 $\beta$ ) und dem KIF5C spezifischen Antikörper H1 gefärbt und einer Untersuchung im Fluoreszenz-Mikroskop unterzogen. Durch die Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzen in Abbildung 30 kann eine Kolokalisation von KIF5C mit sämtlichen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 detektiert werden. Diese Kolokalisation beschränkt sich in allen untersuchten Neuronen auf das Cytoplasma. Zusätzlich konnten die katalytische  $\alpha$ - und die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit im Kern der Neurone lokalisiert werden.



**Abbildung 31:** Kolokalisations-Untersuchungen von KIF5C und der Proteinkinase CK2 in primären Hippocampusneuronen.

Auf Deckgläschen ausgesäte Hippocampusneurone wurden mit Methanol fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und 1 h mit dem Mausantikörper H1 und den verschiedenen Kaninchenseren gegen die CK2-Untereinheiten anti-CK2 $\alpha$  (#26), anti-CK2 $\alpha'$  (#30), anti-CK2 $\beta$  (#269) inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Ziege-anti-Maus ALEXA488 und Ziege-anti-Kaninchen ALEXA594. Vergrößerung: 1000-fach.

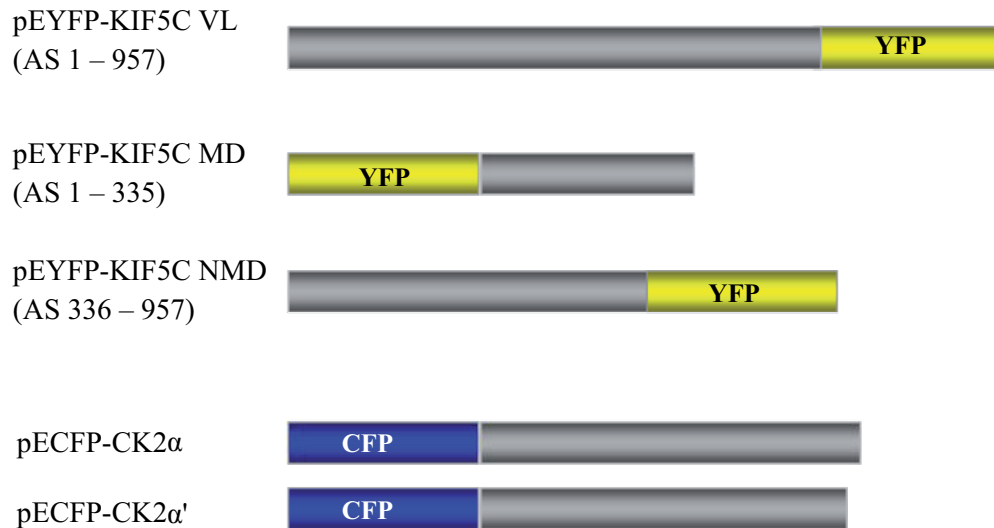
#### 6.14 FRET-Untersuchungen einer *in vivo*-Interaktion von KIF5C und den katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2

Um Aufschluss über eine Interaktion in einer Zelle zu gewinnen kann man eine Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Untersuchung durchführen, denn Untersuchungen mittels der FRET-Methode erlauben die Detektion einer Molekül-Molekül-Interaktion im Nanometer-Bereich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Bei FRET handelt es sich um einen nicht-radiativen Transfer von Energie eines angeregten Donormoleküls auf ein geeignetes Akzeptormolekül, welches sich in geringer Entfernung zum Donor befindet.

Abhängig ist diese sog. FRET-Effizienz von der Distanz zwischen den beiden interagierenden Molekülen. Bei der statischen FRET-Untersuchung, einer Unterart der FRET-Messung, werden die zu untersuchenden Proteine zuerst in unterschiedliche Fluorophor-Vektoren subkloniert. Bei der Wahl der geeigneten Vektoren muss darauf geachtet werden, dass die zu untersuchenden Proteine in zwei unterschiedliche Vektoren subkloniert werden, welche für eine FRET-Messung geeignet sind. Dies bedeutet eine maximale Überlappung der Donoremission und der Akzeptoranregung und eine minimale direkte Anregung des Akzeptormoleküls bei dem Anregungsmaximum des Donormoleküls.

#### **6.14.1 Herstellung und Expressionskontrolle der benötigten Konstrukte**

Für die Untersuchung eines möglichen FRET zwischen KIF5C und den katalytischen CK2-Untereinheiten wurde das Fluorophorenpaar CFP (cyan fluorescent protein) und YFP (yellow fluorescent protein) gewählt. Zwei KIF5C-Konstrukte (pEYFP-KIF5C MD und pEYFP-KIF5C NMD) wurden von der Arbeitsgruppe von F.A. Stephenson aus London zur Verfügung gestellt, die bereits eine Interaktion von KIF5C mit GRIF-1 (Gamma-aminobutyric acid, type A receptor interacting factor-1) mit Hilfe von FRET-Untersuchungen gezeigt hatte (Smith *et al.*, 2006). Die katalytischen CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten und KIF5C mit der Vollängen-DNA-Sequenz wurden mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen KpnI und XbaI in den Vektor pcDNA-ECFP bzw. EcoRI in den Vektor pcDNA-EYFP subkloniert, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lipp (Fachrichtung Zellbiologie, Universität Homburg) zur Verfügung gestellt wurden. Mittels Sequenzierung wurden die Konstrukte auf Korrektheit überprüft. Für die FRET-Messungen standen folgende Konstrukte zur Verfügung (Abbildung 32):

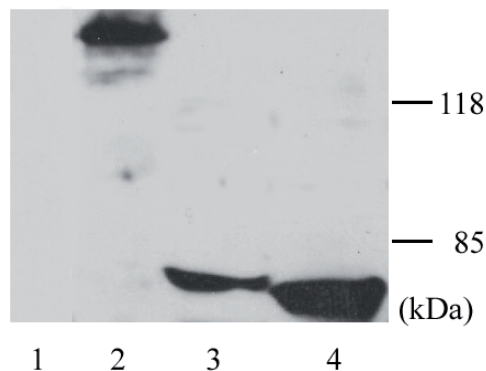


**Abbildung 32:** Schematische Darstellung der FRET-Konstrukte

Die grauen Bereiche kennzeichnen die einklonierte DNA der katalytischen CK2-Untereinheiten und der KIF5C-Fragmente, die farbigen Bereiche kennzeichnen die Fluoreszenzproteine.

Da in der Veröffentlichung von Smith *et al.*, 2006 die Expression der pEYFP KIF5C-Konstrukte bereits untersucht und verifiziert werden konnte, wurde die Expression nur für die hergestellten pECFP-CK2 $\alpha$ , pECFP-CK2 $\alpha'$  und pEYFP-KIF5C VL verifiziert. Hierzu wurden COS-1 Zellen mit 4  $\mu$ g der Konstrukte mittels der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und je 100  $\mu$ g der einzelnen Zellextrakte zusammen mit der Negativkontrolle bestehend aus je 100  $\mu$ g untransfiziertem Zellextrakt über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis der exprimierten Proteine erfolgte mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen das GFP-Protein (Dianova). In Abbildung 33 erkennt man, dass bei der Negativkontrolle keine Proteinbande (Spur 1), bei der Transfektion von COS-1 Zellen mit pEYFP-KIF5C VL (Spur 2), pECFP-CK2 $\alpha$  (Spur 3) und pECFP-CK2 $\alpha'$  (Spur 4) hingegen ein Protein nachweisbar ist. Die Molekulargewichte entsprechen etwa 140 kDa (KIF5C-EYFP), 70 kDa (CK2 $\alpha$ -ECFP) und 65 kDa (CK2 $\alpha'$ -ECFP). Somit sind die hergestellten Konstrukte für eine Expression in COS-1 Zellen geeignet.



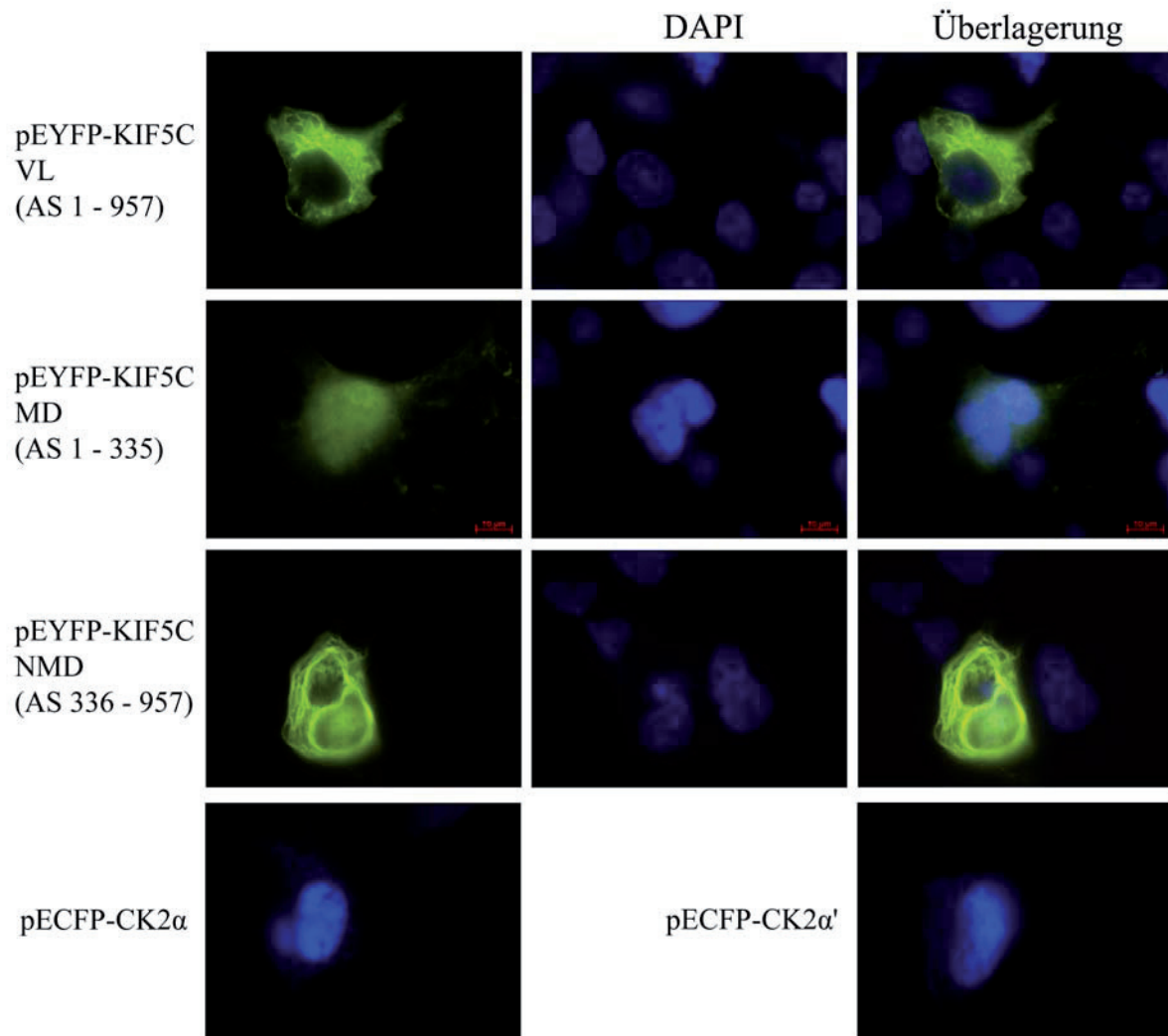


**Abbildung 33:** Nachweis der hergestellten FRET-Konstrukte in COS-1 Zellen.

COS-1 Zellen wurden mit je 4 µg der Konstrukte pEYFP-KIF5C VL, pECFP-CK2 $\alpha$  und pECFP-CK2 $\alpha'$  mittels DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und 100 µg des Gesamtzellextraktes zusammen mit 100 µg Extrakt von nicht transfizierten Zellen über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen das GFP-Protein. Die Visualisierung wurde mittels Peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper und ECL-Methode durchgeführt. Die Molekulargewichte des „prestained“-Molekulargewichtsmarkern von Fermentas sind rechts in der Abbildung angegeben. 1: nicht transfizierte COS-1 Zellen; 2: COS-1 Zellen transfiziert mit pEYFP-KIF5C VL; 3: COS-1 Zellen transfiziert mit pECFP-CK2 $\alpha$ ; 4: COS-1 Zellen transfiziert mit pECFP-CK2 $\alpha'$ .

#### 6.14.2 Lokalisationsuntersuchung der FRET-Konstrukte

Nachdem sämtliche Konstrukte für eine FRET-Messung zur Verfügung standen, konnte im Folgenden die subzelluläre Lokalisation der Proteine untersucht werden. Hierzu wurden COS-1 Zellen mit den einzelnen Plasmiden durch die DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen gewaschen, fixiert und die YFP-Konstrukte einer DAPI-Färbung unterzogen. Eine Behandlung der mit pECFP-CK2 $\alpha$  und pECFP-CK2 $\alpha'$  transfizierten Zellen mit DAPI konnte nicht durchgeführt werden, da dies zu einer Überlagerung im blauen Fluoreszenzbereich und somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hätte. In Abbildung 34 sieht man, dass die von pEYFP-KIF5C und pEYFP-KIF5C NMD kodierten Proteine eine cytoplasmatische Lokalisation zeigen, wohingegen das pEYFP-KIF5C MD kodierte Protein eine fast ausschließliche Kernlokalisation aufweist. Auch die beiden pECFP-Konstrukte der katalytischen CK2-Untereinheiten zeigen eine Konzentration der Fluoreszenz im nukleären Bereich, mit einer deutlich schwächeren Fluoreszenz im Cytoplasma.

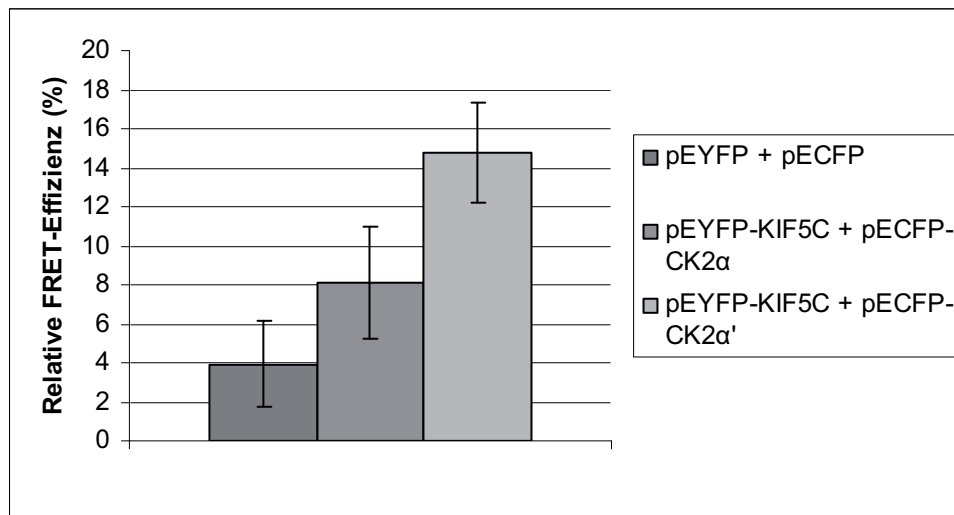


**Abbildung 34:** Lokalisationsüberprüfung der pEYFP-KIF5C und pECFP-CK2 $\alpha$  und - $\alpha'$  Konstrukte. COS-1 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am Folgetag mit Hilfe der DEAE-Dextran-Methode mit den Plasmiden pEYFP-KIF5C VL, pEYFP-KIF5C MD, pEYFP-KIF5C NMD, pECFP-CK2 $\alpha$  und pECFP-CK2 $\alpha'$  transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 3.75% Formaldehyd fixiert und die mit KIF5C transfizierten Zellen einer DAPI-Färbung unterzogen. Nach der Fixierung der Deckgläschen auf Objektträgern wurden die transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet. Vergrößerung 1000-fach.

### 6.14.3 FRET-Messung von KIF5C und den katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2

Der vorangegangene Versuch hatte gezeigt, dass sich die Lokalisation von pEYFP-KIF5C MD vor allem auf den nukleären Bereich beschränkte. Dies stand jedoch nicht im Einklang mit der cytoplasmatischen Verteilung des KIF5C Volllängenproteins, so dass für die folgenden FRET-Untersuchungen nur das Plasmid pEYFP-KIF5C VL verwendet wurde. Auf Deckgläsern ausgesäte HEK-293 Zellen wurden mit den pECFP-CK2 Konstrukten und pEYFP-KIF5C VL kotransfiziert, nach 24 bis 48 Stunden mit 3.75% Formaldehyd fixiert und auf Objektträgern befestigt. Als Negativkontrolle dienten HEK-293 Zellen, die mit pEYFP und pECFP kotransfiziert wurden. Die FRET-Messungen erfolgten an der Nipkow-Messstation (bestehend aus einem Fluoreszenzmikroskop, an das ein CFP-YFP-Kanal-Splitter angeschlossen war) der Arbeitsgruppe von Prof. Lipp mit freundlicher Hilfe von Dr. Kästner. Die relative FRET-Effizienz wurde über 5-minütiges YFP-Akzeptorbleichen bei 530 nm mit Hilfe des Computerprogrammes ImageJ bestimmt. Hierzu wurde ein Bild der kotransfizierten Zelle bei 420 nm im CFP- und YFP-Kanal aufgenommen. Nach dem Bleichen erfolgte eine erneute Aufnahme bei 420 nm. Nur Zellen, deren YFP-Intensität abnahm und deren CFP-Intensität zunahm, wurden ausgewertet. Die erhaltenen Werte wurden mittels Windows Excel und unter Verwendung der Formel:  $(1 - [\text{CFP-Intensität vor Bleichen} / \text{CFP-Intensität nach Bleichen}]) * 100\%$  ausgewertet.

Es wurden 5 Transfektionen durchgeführt und von jeder dieser Transfektionen jeweils 8 kotransfizierte Zellen untersucht. Es konnten jedoch von insgesamt 40 Zellen nur 10 ausgewertet werden. Man erkennt in Abbildung 35, dass die Negativkontrolle aus pEYFP und pECFP eine relative FRET-Effizienz von 4% zeigt. Im Vergleich dazu lässt sich bei der Kotransfektion von pEYFP-KIF5C VL mit pECFP-CK2 $\alpha$  bzw. mit pECFP-CK2 $\alpha'$  eine relative FRET-Effizienz von 8% bzw. 14% messen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich KIF5C in geringerer Entfernung zu CK2 $\alpha'$  als zu CK2 $\alpha$  befindet. Jedoch kann man diese Beobachtung nur als Anhaltspunkt auf Grund der niedrigen Anzahl auswertbarer Zellen ansehen.



**Abbildung 35:** Bestimmung der relativen FRET-Effizienz mit Hilfe des YFP-Bleichen.

HEK-293 Zellen wurden nach dem Aussäen auf Deckgläschen mit 4  $\mu$ g der einzelnen Fluoreszenzkonstrukte mittels Calciumphosphat-Methode kotransfiziert. Nach 24 - 48 h wurden die Zellen fixiert und die relative FRET-Effizienz durch 5-minütiges YFP-Bleichen bei 530 nm und der Auswertung mittels der Formel  $(1 - [\text{CFP-Intensität vor Bleichen} / \text{CFP-Intensität nach Bleichen}]) \cdot 100\%$  bestimmt. Die Standardabweichungen sind als Striche dargestellt (n= 10 transfizierte Zellen).

### 6.15 Phosphorylierungsuntersuchungen zu KIF5C

Durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte als Interaktionspartner für KIF5C sowohl die katalytische  $\alpha$ - als auch  $\alpha'$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2 identifiziert werden. Es konnte weder *in vitro* eine Assoziation von KIF5C mit der  $\alpha$ -Untereinheit, noch mit dem CK2 Holoenzym nachgewiesen werden. Jedoch durfte auf Grund dieser Ergebnisse keine Enzym-Substrat Wechselwirkung ausgeschlossen werden, denn Phosphorylierungen können sowohl von schwacher Natur als auch nur vorübergehend sein.

#### 6.15.1 KIF5C wird *in vitro* von der Proteinkinase CK2 und der freien katalytischen $\alpha'$ -Untereinheit phosphoryliert

Im Folgenden wurde untersucht, ob das Motorprotein KIF5C *in vitro* ein Substrat für die Proteinkinase CK2 darstellt. Hierzu wurde bakteriell exprimiertes, gereinigtes KIF5C einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit der Proteinkinase CK2 unterzogen. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit CK2 und radioaktiv markiertem ATP der Detektion einer

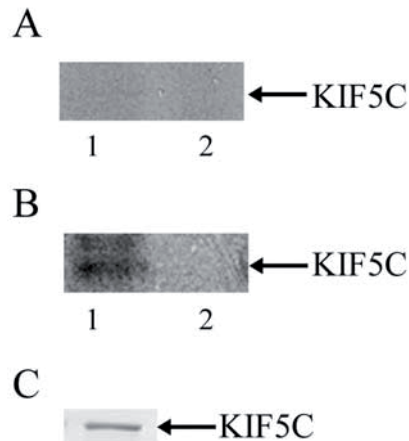
Autophosphorylierung der CK2. Die Proben wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert. Die eingesetzte Proteinmenge wurde mittels Coomassie-Blau Färbung (Abb. 36 Spur 1) visualisiert. Die deutliche Phosphorylierungsbande in Abbildung 36 zeigt, dass KIF5C *in vitro* ein Substrat für die Proteinkinase CK2 darstellt (Spur 3).



**Abbildung 36:** *in vitro* Phosphorylierung von KIF5C durch die Proteinkinase CK2.

Gereinigtes GST-KIF5C wurde einer *in vitro* Kinasereaktion mit dem CK2-Holoenzym unterzogen. Die Proteine wurden über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. 1: Coomassie-Blau Färbung zur Quantifizierung der eingesetzten Proteinmenge, 2: *in vitro* Phosphorylierung des CK2-Holoenzym, 3: *in vitro* Phosphorylierung von KIF5C durch das CK2-Holoenzym.

Da die CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten *per se* eine katalytische Aktivität besitzen, wurde im Folgenden untersucht, ob KIF5C auch von der freien katalytischen  $\alpha$ - und/oder  $\alpha'$ -Untereinheit phosphoryliert wird. Die Kinasereaktion wurde analog dem vorhergehenden Versuch durchgeführt. Als Kontrolle wurden CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert, um eine mögliche Autophosphorylierung zu detektieren. Die Autoradiographie in Abbildung 37 A zeigt, dass keine Phosphorylierungsbande bei einer Kinasereaktion von KIF5C mit CK2 $\alpha$  zu erkennen ist. Bei einer Kinasereaktion von KIF5C mit CK2 $\alpha'$  kann hingegen eine schwache Phosphorylierung detektiert werden, die in der Kontrolle nicht vorhanden ist (Abb. 37 B). Somit ist das Motorprotein KIF5C ein Substrat für das CK2 Holoenzym und die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit, nicht jedoch für die CK2 $\alpha$ -Untereinheit.



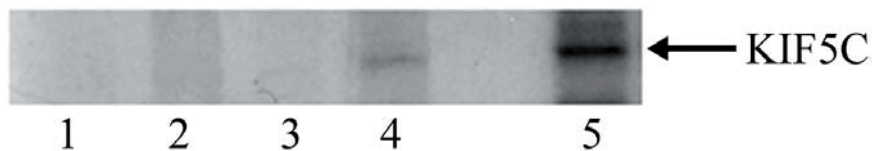
**Abbildung 37:** *in vitro* Phosphorylierung von KIF5C durch die katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2.

Gereinigtes GST-KIF5C wurde mit CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  (Spur 1) einer *in vitro* Kinasereaktion mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP unterzogen. Als Kontrolle dienten CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  (Spur 2) inkubiert mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP. Die Proteine wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. **A:** *in vitro* Phosphorylierung von KIF5C mit CK2 $\alpha$ ; **B:** *in vitro* Phosphorylierung von KIF5C mit CK2 $\alpha'$ ; **C:** Coomassie-Blau Färbung der eingesetzten KIF5C-Menge.

### 6.15.2 KIF5C wird *in vivo* von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert

Eine *in vitro* Phosphorylierung durch die Proteinkinase CK2 ist immer ein Hinweis darauf, dass das Protein auch *in vivo* von dieser Kinase phosphoryliert wird. Es kann jedoch vorkommen, dass diese Stelle von einer anderen Proteinkinase phosphoryliert wird oder dass die Faltung des nativen Proteins eine Phosphorylierung an der betreffenden Stelle nicht zulässt. Aus diesem Grund musste überprüft werden, ob KIF5C auch *in vivo* durch die Proteinkinase CK2 phosphoryliert wird. Daher wurden im Folgenden SH-SY5Y Zellen in einer *in vivo* Phosphorylierungs-Untersuchung mit radioaktiver  $^{33}\text{P}$ -Ortho-Phosphorsäure markiert. Zugleich wurden in einem zweiten Ansatz SH-SY5Y Zellen mit dem spezifischen CK2 Inhibitor TBB (50  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Sollte es sich bei KIF5C um ein *in vivo* Substrat für die Proteinkinase CK2 handeln, dann würde dies durch eine Abschwächung oder ein Verschwinden einer möglichen Phosphorylierungsbande ersichtlich werden. Aus den markierten Zellen wurde das Cytoplasma extrahiert und eine Immunpräzipitation mit Protein

A-Sepharose und dem KIF5C spezifischen Serum #976 durchgeführt. Die Immunkomplexe und die Vorpräzipitate wurden eluiert, über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Autoradiographie detektiert. Als Positivkontrolle diente der Immunkomplex eines *in vitro* translatierten und mit CK2 phosphorylierten KIF5C. Man sieht in Abbildung 38, dass in beiden Vorpräzipitaten (Spur 1 und 3) kein phosphoryliertes Protein detektierbar ist. Am Immunpräzipitat der unbehandelten SH-SY5Y Zellen (Spur 4) kann im Gegensatz zu den mit TBB behandelten Zellen (Spur 2) eine schwache Phosphorylierungsbande detektiert werden, die auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle (Spur 5) liegt. Somit wird KIF5C nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert.



**Abbildung 38:** *In vivo* Phosphorylierung von KIF5C durch die Proteinkinase CK2.

SH-SY5Y Zellen wurden 5 Stunden mit  $^{33}\text{P}$ -Phosphorsäure markiert. Nach der Extraktion des Cytoplasmas wurde KIF5C mit Serum #976 immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden eluiert, über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie visualisiert. Zusätzlich diente einer *in vitro* Kinasereaktion unterzogenes *in vitro* translatiertes KIF5C als Positivkontrolle. 1: 2.VP von SH-SY5Y Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  TBB, 2: IP von SH-SY5Y Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  TBB, 3: 2.VP von SH-SY5Y Zellen unbehandelt, 4: IP von SH-SY5Y Zellen unbehandelt, 5: *in vitro* translatiertes KIF5C nach *in vitro* Kinasereaktion mit CK2.

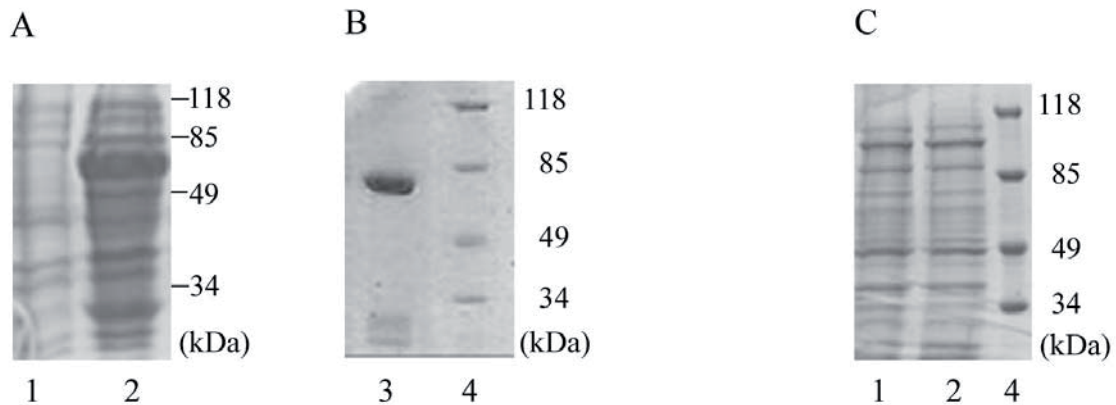
### 6.16 Die Identifikation der CK2-Phosphorylierungsstellen von KIF5C

Nachdem das Motorprotein KIF5C *in vitro* und *in vivo* als Substrat für die Proteinkinase CK2 identifiziert wurde, stellte sich nun die Frage nach der genauen Lokalisation dieser Phosphorylierung. Eine Möglichkeit potentielle Phosphorylierungsstellen zu untersuchen, ist eine *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit rekombinanten Fragmenten des Volllängenproteins. Somit kann es ermöglicht werden, die Phosphorylierungen auf der Polypeptidkette des Volllängenproteins einem bestimmten Teilbereich zuzuordnen.

### 6.16.1 Herstellung der benötigten DNA-Konstrukte, Proteinexpression und Reinigung

In den zuvor durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid- und FRET-Untersuchungen wurde das KIF5C-Volllängenprotein bereits in die Motordomäne (MD, AS: 1 - 335) und die Nicht-Motordomäne (NMD, AS: 336 - 957) geteilt. Daher wurde diese Teilung auch für das folgende Experiment beibehalten. Sowohl die DNA-Sequenz der Motordomäne, als auch der Nicht-Motordomäne wurden über EcoRI-Schnittstellen in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T1 subkloniert und mittels Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Zur Proteinexpression wurden die Konstrukte in *E. coli* BL21 transformiert und mit 1 mM IPTG induziert. Vor und nach Induktion wurde ein Aliquot der Bakterien in SDS-Probenpuffer aufgenommen, über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinexpression mittels Coomassie-Blau Färbung visualisiert. Bei erfolgreicher Proteinexpression erfolgte eine Reinigung und eine erneute Kontrolle durch eine Coomassie-Blau Färbung. Wie in Abbildung 39 A zu erkennen ist, kann eine deutliche Expression bei pGEX4T1-KIF5C MD festgestellt werden. Auch nach der Proteinreinigung ist das bakteriell exprimierte Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa deutlich vorhanden (Abb. 39 B). Bei pGEX-4T1-KIF5C NMD kann hingegen kein Unterschied zwischen nicht induzierten und induzierten Bakterien detektiert werden (Abb. 39 C). Somit konnte die Motordomäne von KIF5C als gereinigtes Protein für weitere Untersuchungen verwendet werden, wohingegen pGEX-4T1-KIF5C NMD für eine Proteinexpression in BL21 Bakterien nicht geeignet ist.

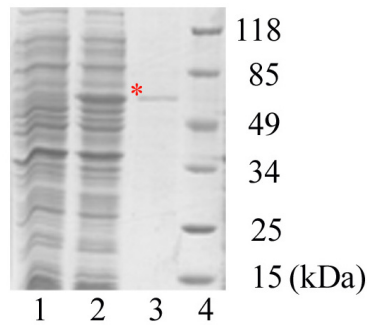




**Abbildung 39:** Induktion von BL21 Bakterien transformiert mit pGEX-4T1-KIF5C MD, pGEX-4T1-KIF5C NMD und Proteinreinigung.

Transformierte BL21 Bakterien wurden 3 h mit 1 mM IPTG bei 37°C induziert. Ein Aliquot der Bakterien wurde vor und nach Induktion entnommen, in SDS-Probenpuffer denaturiert und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression wurde mittels Coomassie-Blau Färbung visualisiert. Bei erfolgreicher Induktion wurde eine Proteinreinigung durchgeführt und erneut durch Coomassie-Blau Färbung verifiziert. **A:** Induktion von 1: transformierte BL21 vor Induktion, 2: transformierte BL21 nach Induktion, **B:** 3: nach Induktion gereinigtes KIF5C MD-Protein. **C:** Induktion der mit pGEX-4T1-KIF5C NMD transformierten BL21, 4: die Molekulargewichte des „prestained“-Molekulargewichtsmarkern sind rechts in der Abbildung angegeben.

Da die Induktion der mit pGEX-4T1-KIF5C NMD transformierten *E. coli* nicht zu einer Proteinexpression führte, wurde die Nicht-Motordomäne über EcoRI-Schnittstellen in den bakteriellen Expressionsvektor pRSET B subkloniert und sequenziert. Das pRSET B-Plasmid besitzt ein N-terminales „his-tag“, welches die Proteinreinigung erleichtern soll. Die Transformation und Induktion erfolgte analog zu den zuvor durchgeführten Experimenten. In Abbildung 40 erkennt man, dass nach der Induktion eine Proteinbande bei etwa 65 kDa detektierbar ist. Dieses Protein ist nach einer Reinigung weiterhin deutlich zu erkennen. Somit kann die Nicht-Motordomäne als rekombinantes Protein hergestellt und für weitere Untersuchungen verwendet werden.



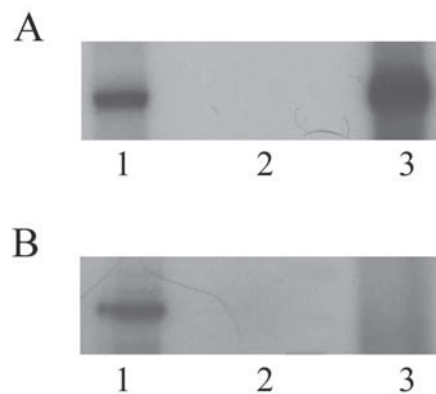
**Abbildung 40:** Induktion von BL21, transformiert mit pRSET-KIF5C NMD und Proteinreinigung.

Transformierte BL21 Bakterien wurden 3 h mit 1 mM IPTG bei 37°C induziert. Ein Aliquot der Bakterien wurde vor und nach Induktion entnommen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression wurde mittels Coomassie-Blau Färbung visualisiert. Bei erfolgreicher Induktion wurde eine Proteinreinigung durchgeführt und erneut durch Coomassie-Blau Färbung verifiziert. 1: transformierte BL21 vor Induktion; 2: transformierte BL21 nach Induktion; 3: KIF5C NMD nach der Reinigung. Ein \* kennzeichnet das KIF5C NMD-Fusionsprotein. 4: die Molekulargewichte des „prestained“-Molekulargewichtsmarkers sind rechts in der Abbildung angegeben.

#### 6.16.2 Die Nicht-Motordomäne von KIF5C wird *in vitro* von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert

Zur näheren Lokalisierung der möglichen Phosphorylierungsstellen wurden die rekombinanten KIF5C-Fragmente einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP und gereinigtem CK2-Holoenzym unterzogen. Um eine Autophosphorylierung der verwendeten Proteine auszuschließen, wurden als Kontrollen die KIF5C-Fragmente und das CK2-Holoenzym mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert. Die möglichen Phosphorylierungen wurden mittels Autoradiographie detektiert. Man erkennt in Abbildung 41 A eine Phosphorylierung der Motordomäne (Spur 1). Diese Bande lässt sich jedoch auch bei der Autophosphorylierung der Proteinkinase CK2 detektieren (Spur 3). Bei einer Inkubation der Motordomäne mit radioaktivem ATP wird keine Phosphorylierungsbande ersichtlich (Spur 2). Dies bedeutet, dass die Motordomäne von KIF5C weder autophosphoryliert noch *in vitro* von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert wird. Bei der Nicht-Motordomäne von KIF5C kann eine deutliche Phosphorylierungsbande detektiert werden (Spur 1), die in beiden Kontrollen nicht erkennbar ist (Abb. 41 B, Spur 2 und 3). Somit ist eine Autophosphorylierung der KIF5C Nicht-Motordomäne auszuschließen. Außerdem kann man feststellen, dass sich mögliche

CK2 Phosphorylierungsstellen in einer Region von Aminosäure 336 - 957 innerhalb der Polypeptidkette von KIF5C befinden.



**Abbildung 41:** *in vitro* Phosphorylierung der KIF5C-Fragmente durch die Proteinkinase CK2.

Die gereinigten KIF5C MD- und KIF5C NMD-Fragmente wurden einer *in vitro* Kinasereaktion mit dem CK2-Holoenzym und radioaktiv markiertem ATP unterzogen. Als Kontrollen wurden das CK2-Holoenzym und die KIF5C-Fragmente in separaten Ansätzen mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mittels Autoradiographie detektiert. **A:** KIF5C MD Phosphorylierung, **B:** KIF5C NMD Phosphorylierung. 1: KIF5C MD/NMD mit CK2 und  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP, 2: KIF5C MD/NMD mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP, 3: CK2 mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP.

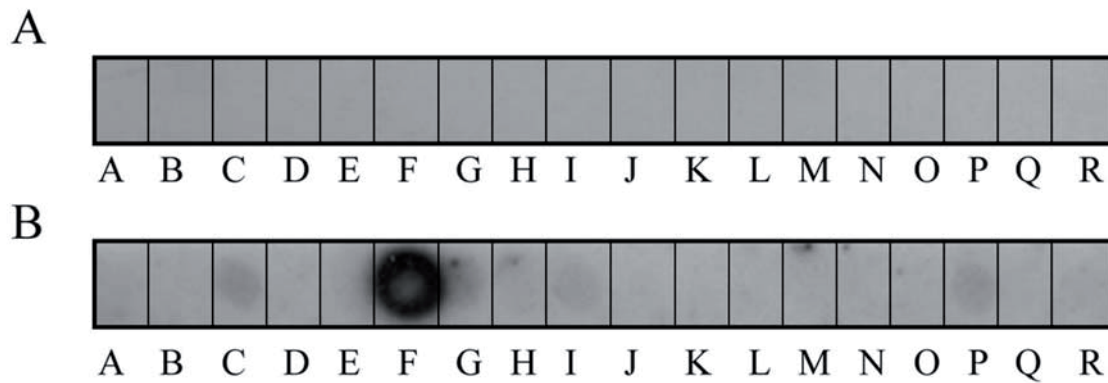
### 6.16.3 Die Identifikation der CK2-Phosphorylierungsstellen von KIF5C mit Hilfe von Peptidfiltern

Nachdem KIF5C als Substrat für die Proteinkinase CK2 identifiziert und eine mögliche Phosphorylierung auf den Bereich der Nicht-Motordomäne eingeschränkt wurde, wurden nun die potentiellen Phosphorylierungsstellen näher untersucht. Die Proteinkinase CK2 kann sowohl Serin als auch Threonin phosphorylieren. Wichtig ist jedoch, dass sich an Position  $n+3$  eine saure Aminosäure befindet (Meggio *et al.*, 1994, Songyang *et al.*, 1996). Somit besitzt das Phosphorylierungsmotiv der Proteinkinase CK2 folgende Sequenz: S/TxxD/E. Nach dieser Sequenz wurde die Polypeptidkette des Motorproteins KIF5C mit Hilfe des im Internet erhältlichen Programms ExPASy abgesucht. Die Suche ergab 19 mögliche Phosphorylierungsstellen im KIF5C-Vollängenprotein, wobei zwei dieser Stellen unmittelbar nebeneinander liegen. Zur Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung durch die Proteinkinase CK2 wurden diese Sequenzen als Dekapeptide auf einen Filter gespottet

(Tabelle 2) und einer *in vitro* Kinasereaktion mit gereinigtem CK2-Holoenzym und radioaktiv markierten ATP unterzogen. Als Negativkontrolle wurde ein Filter nur mit radioaktivem ATP inkubiert, um eine mögliche ATP-Bindung von KIF5C zu detektieren. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Filter getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen. In Abbildung 42 A sieht man, dass in der Negativkontrolle kein Spot detektiert werden kann. Somit ist eine ATP-Bindung an diesen Peptiden auszuschließen. In Abbildung 42 B kann auf dem mit CK2 inkubierten Filter nur ein Peptid als positives Phosphorylierungssignal identifiziert werden. Es handelt es sich hierbei um das Peptid F, woraus sich die CK2-Phosphorylierungsstelle Threonin 338 ergibt.

Peptid	Phosphorylierungsstelle	Aminosäuresequenz des Peptidfilters
A	AS: 57-60	PPNTTQE <sup>T</sup> QVY
B	AS: 122-125	HIYSMDENLE
C	AS: 134-137	IKVSYFEIYL
D	AS: 175-179	RFVSSPEEVM
E	AS: 242-245	VSKTGAEGAV
F	AS: 338-341	LELTAE <sup>T</sup> EWKK
G	AS: 383-386	EQISAKDQKN
H	AS: 410-413	AGISTEEKEK
I	AS: 459-462	LASTRRDYEK
J	AS: 529-532	LTTTQRELSQ
K	AS: 572-575	DVKTLADVNG
L	AS: 622-625	MNASERELAA
M	AS: 634-637	LLISQHEAKI
N	AS: 642-645	KIKSLTDDYM
O	AS: 663-666	SQDSLSEELA
P	AS: 681-684	HEVSFQDKEK
Q	AS: 709-712	QMESHREAHQ
R	AS: 835-838	QKISFLENNL

**Tabelle 2:** Zehnerpeptide mit putativen CK2-Phosphorylierungsstellen im KIF5C Protein. Die mögliche Phosphorylierungsstelle ist in fett gedruckten Buchstaben dargestellt.



**Abbildung 42:** Bestimmung der CK2-Phosphorylierungsstellen von KIF5C.

Die in Tabelle 2 identifizierten potentiellen CK2-Phosphorylierungsstellen wurden als 10 AS lange Peptide auf Whatman-Filterpapier gespottet und anschließend einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit CK2-Holoenzym und radioaktivem  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP unterzogen. Nach dem Trocknen der Filter wurden die phosphorylierten Peptide durch Autoradiographie visualisiert. **A:** Kontrollfilter ohne CK2 zum Ausschluss einer ATP-Bindung. **B:** Phosphorylierung der Peptide durch das CK2-Holoenzym.

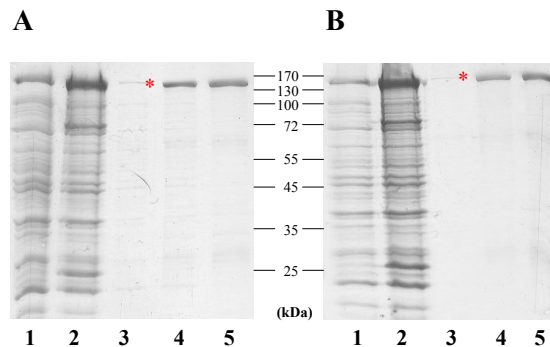
### 6.17 Untersuchungen zur Phosphorylierung von KIF5C durch die Proteinkinase CK2 mit Hilfe von Phosphorylierungsmutanten

Nachdem nur eine potentielle CK2-Phosphorylierungsstelle für KIF5C mit Hilfe der Peptidfilter identifiziert werden konnte, wurde Threonin 338 zu Alanin und Aspartat mutagenisiert. Bei Alanin handelt es sich um eine Aminosäure, die nicht durch die Proteinkinase CK2 phosphoryliert werden kann. Auch die saure Aminosäure Aspartat kann zwar nicht von der CK2 phosphoryliert werden, imitiert jedoch auf Grund ihrer negativen Ladung eine Phosphorylierung. Handelt es sich bei Threonin 338 um die einzige CK2-Phosphorylierungsstelle von KIF5C, sollten bei einer Kinasereaktion von KIF5C mit CK2 bei diesen zwei Mutanten keine Phosphorylierungen nachweisbar sein.

#### 6.17.1 Herstellung der benötigten DNA-Konstrukte, Proteinexpression und Reinigung

Die Herstellung der Phosphorylierungsmutanten von KIF5C wurde im Folgenden mit Hilfe des auf der PCR-Methode basierenden Mutagenisierungskit von Stratgene durchgeführt. Als Template wurde pGEX-4T1-KIF5C verwendet und mittels spezifischer Primer mutagenisiert, welche an Stelle von Threonin 338 entweder Alanin oder Aspartat aufwiesen. Die

Mutagenisierung wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Die erhaltenen Konstrukte pGEX-4T1-KIF5C T338A und pGEX-4T1-KIF5C T338D wurden in *E. coli* Rosetta Bakterien transformiert, die Bakterien induziert, die exprimierten Proteine gereinigt und über eine Coomassie-Blau Färbung nachgewiesen. In Abbildung 43 A und B ist eine deutliche Proteinexpression zu erkennen (Spur 2). Des Weiteren kann die erfolgreiche Proteinreinigung verifiziert werden (Spur 3-5). Somit können beide Phosphomutanten für weitere Versuche verwendet werden.



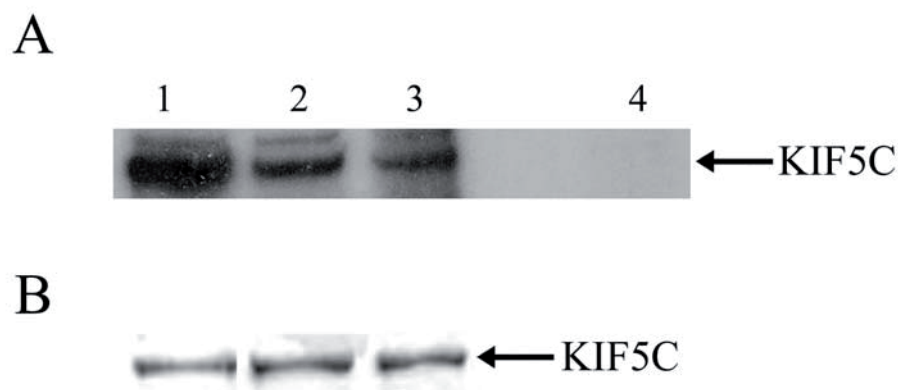
**Abbildung 43:** Induktion von Rosetta Bakterien, transformiert mit den Phosphomutanten von KIF5C und Proteinreinigung.

Rosetta Bakterien wurden mit den Plasmiden pGEX-4T1-KIF5C T338A und pGEX-4T1-KIF5C T338D transformiert und mit 0.3 mM IPTG bei einer  $OD_{600nm}=1$  für 3 Stunden bei 37°C induziert. Die Bakterien wurden lysiert, die Proteine an GSH-Sepharose gebunden und mit Glutathion eluiert. Die Eluate wurden über Nacht gegen Puffer R1 dialysiert, ein Aliquot entnommen und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinfärbung wurde mit Coomassie-Blau durchgeführt. 1: Rosetta vor Induktion, 2: Rosetta nach Induktion, 3: Eluat 10 mM Glutathion, 4: Eluat 20 mM Glutathion, 5 Eluat 30 mM Glutathion. **A:** Induktion von pGEX-4T1-KIF5C T338A in *E. coli* Rosetta und Proteinreinigung, **B:** Induktion von pGEX-4T1-KIF5C T338D in *E. coli* Rosetta und Proteinreinigung. Ein \* kennzeichnet die gereinigten KIF5C-Fusionsproteine. Die Molekulargewichte des „prestained“-Molekulargewichtsmarkern von Fermentas sind in der Mitte der Abbildung angegeben.

### 6.17.2 *In vitro* Phosphorylierung von KIF5C und seiner Phosphorylierungsmutanten durch die Proteinkinase CK2

Nachdem die Phosphorylierungsmutanten von KIF5C hergestellt wurden, konnte im Folgenden die Untersuchung der Phosphorylierungsstelle T338 durchgeführt werden. Hierzu wurden die gereinigten Proteine KIF5C wt, KIF5C T338A und KIF5C T338D einer *in vitro*

Kinasereaktion mit dem CK2 Holoenzym unterzogen. Die phosphorylierten Proteine wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Zusätzlich wurde eine Coomassie-Blau Färbung durchgeführt, um den Einsatz gleicher Proteinmengen zu verifizieren. In Abbildung 44 A erkennt man sowohl bei KIF5C wt eine Phosphorylierung als auch eine Phosphorylierung beider Phosphomutanten KIF5C T338A und KIF5C T338D. Man erkennt jedoch einen Unterschied in der Intensität; so ist die Phosphorylierung von KIF5C wt am stärksten ausgeprägt, wohingegen die Phosphorylierung der beiden Mutanten von schwächerer Intensität ist. Durch die Coomassie-Blau Färbung in Abbildung 44 B wird der Einsatz gleicher Proteinmengen ersichtlich. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei der Aminosäure T338 um eine Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase CK2 innerhalb von KIF5C handelt. Da die Phosphorylierung jedoch in abgeschwächter Form bei der Alanin- und Aspartatmutante detektiert werden kann, scheint es sich bei Threonin 338 nicht um die einzige *in vitro* CK2-Phosphorylierungsstelle innerhalb der Polypeptidkette von KIF5C zu handeln.



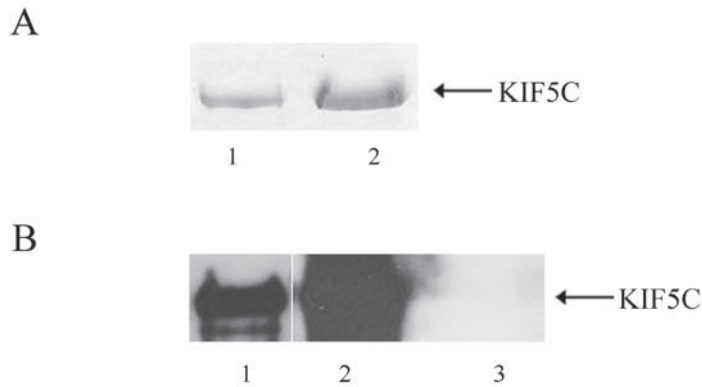
**Abbildung 44:** *in vitro* Phosphorylierung von GST-KIF5C wt und seiner Phosphorylierungsmutanten durch die Proteinkinase CK2.

**A:** Die rekombinanten KIF5C-Proteine und das CK2-Holoenzym wurden einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit dem CK2-Holoenzym und radioaktiv markiertem ATP unterzogen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel und die Detektion mittels Autoradiographie. 1: GST-KIF5C wt, 2: GST-KIF5C T338A, 3: GST-KIF5C T338D, 4: CK2. **B:** Coomassie-Blau Färbung zur Überprüfung der eingesetzten Proteinmenge.

### 6.18 Der Einfluss von KIF5C auf die Kinaseaktivität Proteinkinase CK2

Es bestand die Überlegung, dass eine Assoziation von KIF5C sich möglicherweise regulierend auf die Kinaseaktivität der Proteinkinase CK2 oder deren katalytische Untereinheiten auswirken könnte. So konnte bereits gezeigt werden, dass die CK2-Aktivität durch die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit moduliert (Grankowski *et al.*, 1991) oder dass die Kinaseaktivität der CK2 durch die Bindung an den Tumorsuppressor p53 negativ beeinflusst werden kann (Schuster *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob KIF5C einen Einfluss auf die Kinaseaktivität der CK2 bei der Phosphorylierung des CK2-spezifischen Substratpeptids RRRDDDSDDD ausüben kann. Um jedoch eine mögliche Beeinflussung der Kinaseaktivität durch KIF5C als konkurrierendes Substrat auszuschließen, wurde KIF5C zuvor in Insektenzellen exprimiert und gereinigt. Durch die Expression sollte KIF5C posttranslational modifiziert und mögliche Phosphorylierungsstellen bereits phosphoryliert sein. KIF5C wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in den pBacPAK-His1-Vektor subkloniert und durch Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Mit Hilfe des BaculoGold®-Systems der Firma Pharmingen erfolgte die Herstellung eines rekombinanten Virus, mit dem Sf9-Insektenzellen infiziert wurden. Die Reinigung des exprimierten Proteins über  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Blau Färbung und Westernblot-Analyse mit den Antikörpern gegen KIF5C (H1 und Serum #976) überprüft. Als Negativkontrolle dienten im Westernblot nicht infizierte Sf9-Zellen. Sowohl nach Coomassie-Blau Färbung, als auch nach der Westernblot-Analyse kann eine deutliche Proteinbande nach der Reinigung detektiert werden. Diese Bande kann im Westernblot mit den KIF5C spezifischen Antikörpern in nicht infizierten Zellen nicht visualisiert werden.

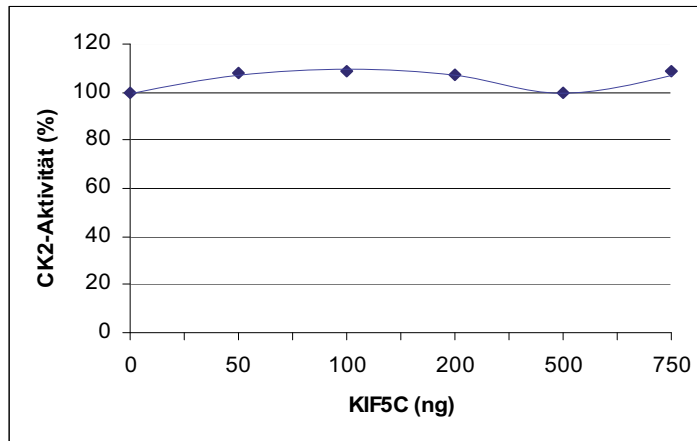




**Abbildung 45:** Proteinreinigung von rekombinantem His-KIF5C aus Insektenzellen.

Sf9-Zellen wurden mit einem Baculovirus mit pBakPAK-KIF5C infiziert, 3 Tage kultiviert, lysiert und das Protein anschließend mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose gereinigt. **A:** Expressions- und Reinigungskontrolle des His-KIF5C mittels Coomassie-Blau Färbung. 1: Eluat 50 mM Imidazol, 2: Eluat 100 mM Imidazol **B:** Nachweis von gereinigtem KIF5C mit verschiedenen Antikörpern. 1: Nachweis von His-KIF5C mit dem Antikörper H1 nach der Proteinreinigung 2: Nachweis von His-KIF5C mit Serum #976 nach der Proteinreinigung, 3: Nachweis von KIF5C mit Serum #976 an nicht infizierten Sf9-Zellen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und ECL-Methode.

Mit Hilfe des rekombinanten KIF5C konnte im Folgenden ein möglicher Einfluss von KIF5C auf die Kinaseaktivität der CK2 untersucht werden. Hierzu wurde das CK2-Substratpeptid einer *in vitro* Phosphorylierung durch die Proteinkinase CK2 mit steigenden Mengen an KIF5C (0 - 750 ng) unterzogen. Als Kontrollexperiment wurden in einem Parallelansatz steigende Mengen an BSA mitgeführt. Die CK2-Aktivität wurde durch die Phosphorylierung des Substratpeptids im Szintillationszähler bestimmt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse für KIF5C erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel. Dabei wurde die CK2-Aktivität ohne KIF5C auf 100% gesetzt. Man erkennt in Abbildung 46, dass bei einer Zugabe von steigenden Mengen an KIF5C keine Änderung der CK2-Aktivität zu beobachten ist. Die CK2-Aktivität zeigt bei einer KIF5C-Zugabe von 100 ng nur eine Steigerung von 8% im Vergleich zum Kontrollwert ohne KIF5C. Auch bei größeren Mengen KIF5C (750 ng) in der Phosphorylierungsreaktion ist kein Effekt zu beobachten. Somit übt KIF5C keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität des Holoenzym der Proteinkinase CK2 aus.

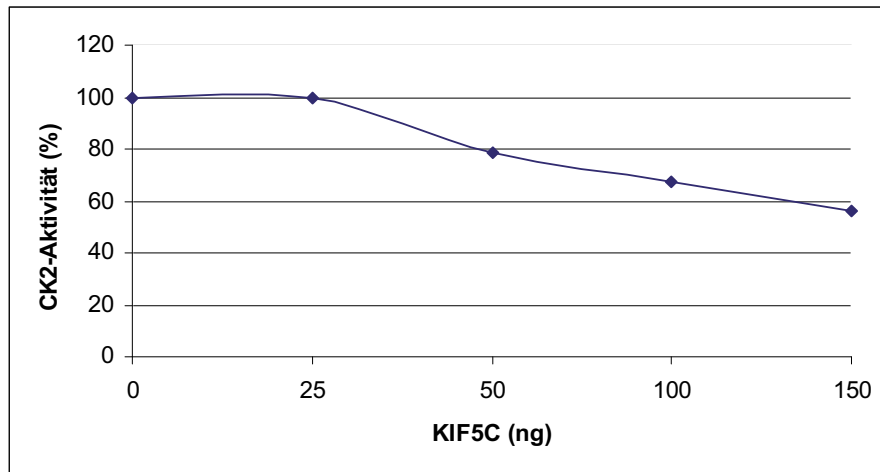


**Abbildung 46:** Der Einfluss von KIF5C auf Kinaseaktivität der Proteinkinase CK2.

Gereinigtes KIF5C wurde in steigenden Mengen zu einem radioaktiven *in vitro* Phosphorylierungsassay des CK2-Holoenzym mit dem synthetischen Substratpeptid RRRDDDSDDD hinzugegeben. Die Kinaseaktivität wurde durch die Phosphorylierung des Substratpeptids im Szintillationszähler bestimmt. Die graphische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel. Die Aktivität des CK2-Holoenzym ohne KIF5C wurde auf 100% gesetzt.

### 6. 19 Der Einfluss von KIF5C auf die Kinaseaktivität von CK2 $\alpha'$

Da KIF5C *in vitro* und *in vivo* mit der katalytischen CK2 $\alpha'$ -Untereinheit assoziierte und auch von ihr phosphoryliert werden konnte, stellte sich die Frage ob KIF5C möglicherweise auch einen Einfluss auf deren Kinaseaktivität nehmen kann. Die Untersuchung einer möglichen Aktivitätsänderung der CK2 $\alpha'$  erfolgte analog zu dem zuvor durchgeführten Versuch. Zu der *in vitro* Kinasereaktion wurde in steigenden Mengen KIF5C (0 - 150 ng) hinzugegeben. Parallel wurden steigende Mengen BSA zur Kontrolle in einem separaten Ansatz mitgeführt. Die Kinaseaktivität wurde anhand der Phosphorylierung des synthetischen Substratpeptids im Szintillationsgerät gemessen und mit Hilfe von Microsoft Excel graphisch ausgewertet. In Abbildung 47 erkennt man, dass steigende Mengen von KIF5C zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der CK2 $\alpha'$ -Aktivität *in vitro* führt. So sinkt die Aktivität der CK2 $\alpha'$  bei einer Zugabe von 150 ng KIF5C auf etwa 60%. Somit kann die Hemmung der CK2 $\alpha'$  spezifischen Kinaseaktivität eine mögliche Auswirkung der Interaktion von CK2 mit KIF5C sein.



**Abbildung 47:** Der Einfluss von KIF5C auf die Kinaseaktivität von CK2α'.

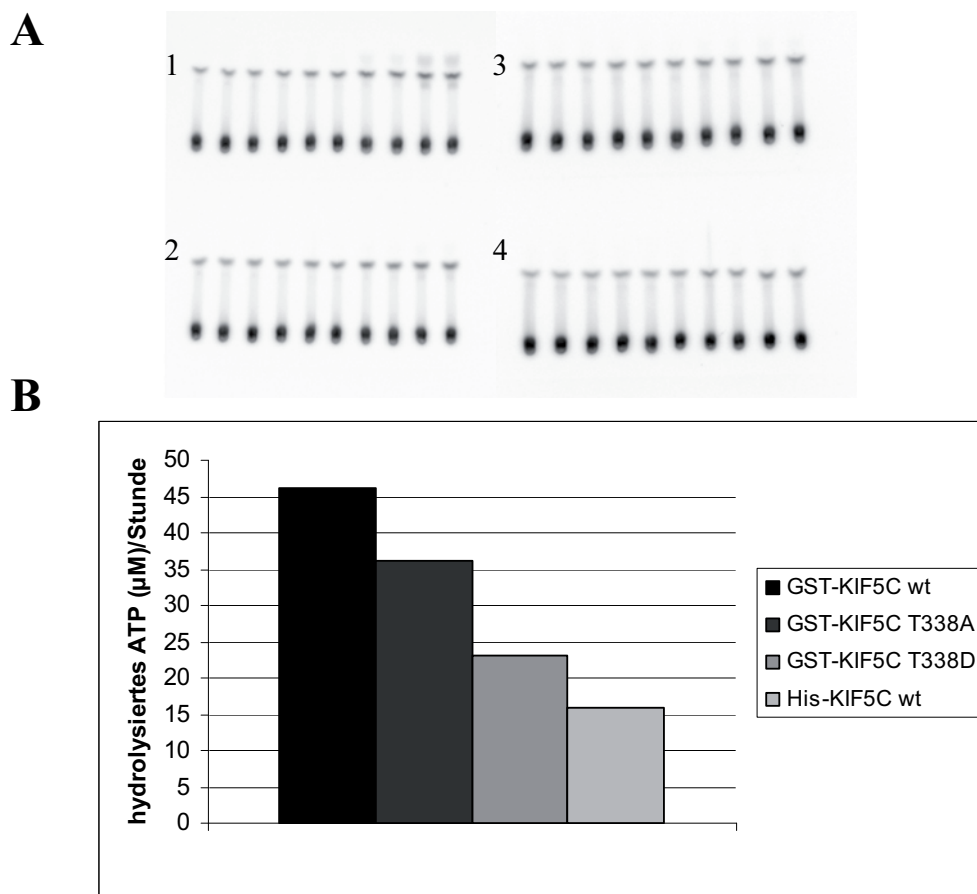
Gereinigtes KIF5C wurde in steigenden Mengen zu einem radioaktiven *in vitro* Phosphorylierungsassay des Substratpeptids RRRDDDSDDD mit der CK2α'-Untereinheit hinzugegeben. Die Kinaseaktivität wurde durch die Phosphorylierung des Substratpeptids im Szintillationszähler bestimmt. Die graphische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel. Die CK2α'-Aktivität ohne KIF5C wurde auf 100% gesetzt.

### 6.19 Der Einfluss der Mutagenisierung auf die ATPase-Aktivität von KIF5C

Durch den zuvor durchgeführten Versuch konnte festgestellt werden, dass es sich bei der Aminosäure T338 zwar um eine mögliche Phosphorylierungsstelle, nicht jedoch um die einzige Phosphorylierungsstelle innerhalb der Polypeptidkette von KIF5C handelte. Die Aminosäure T338 liegt an einer für das KIF5C Protein wichtigen Stelle innerhalb der Polypeptidkette, dem so genannten „Hinge“. Diese α-helikale coiled coil Struktur verbindet mechanisch zwei Motordomänen miteinander, um so eine Bewegung eines Kinesindimers über ATP-Hydrolyse zu ermöglichen (Hackney 1994, Hancock & Howard, 1999). Zur Untersuchung der ATPase-Aktivität von KIF5C und den hergestellten KIF5C Mutanten wurde mit den gereinigten, bakteriell exprimierten KIF5C-Proteinen ein ATPase Assay unter „steady state“ Bedingungen mit radioaktivem ATP durchgeführt. Zum Vergleich der einzelnen ATPase-Aktivitäten wurde zusätzlich das gereinigte, in Insektenzellen exprimierte KIF5C untersucht. Das hydrolysierte ATP wurde densitometrisch am Phosphoimager quantifiziert (Abb. 48 A). Die Berechnung des hydrolysierten ATP wurde mit folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Hydrolysiertes ATP } (\mu\text{M}) = (P_i / [\gamma^{32}\text{P}]P_i / ([\gamma^{32}\text{P}]ATP + [\gamma^{32}\text{P}]P_i)) * 250 \mu\text{M}$$

Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte mit den Computerprogrammen ImageQuant 5.1 und Microsoft Excel. Abbildung 48 B zeigt, dass der höchste ATP-Umsatz nach 1 Stunde bei dem bakteriell exprimierten KIF5C wt gemessen werden kann. Die zweithöchste Geschwindigkeit des ATP-Umsatzes kann bei der Alanin-Mutante von KIF5C detektiert werden, gefolgt von der Aspartat-Mutante von KIF5C. Den geringsten ATP-Umsatz zeigt das in Insektenzellen exprimierte KIF5C. Somit besitzen die bakteriell exprimierten, nicht posttranslational modifizierten KIF5C-Proteine eine deutlich höhere ATPase-Aktivität als das in Insektenzellen exprimierte und somit postranslational modifizierte KIF5C.



**Abbildung 48:** „steady state“ ATPase-Assay der gereinigten KIF5C-Proteine.

Je 500 ng der gereinigten KIF5C-Proteine wurden mit ATPase-Puffer auf ein Endvolumen von 10  $\mu$ l aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von je 10  $\mu$ l ATPase-Puffer mit 1  $\mu$ Ci  $^{32}$ P-ATP und 500  $\mu$ M nicht radioaktivem ATP. Nach 2,5,10,30 und 60 min wurden jeweils 3  $\mu$ l entommen, mit 3  $\mu$ l EDTA (60 mM) versetzt und über eine Dünnschicht-Chromatographie-Platte aufgetrennt. **A:** Densitometrische Auswertung am Phosphoimager; **B:** Graphische Darstellung der Menge an hydrolysiertem ATP nach 60 Minuten mittels Microsoft Excel. 1: GST-KIF5C wt, 2: GST-KIF5C T338A, 3: GST-KIF5C T338D, 4: His-KIF5C wt (Sf9).

## 7. Diskussion

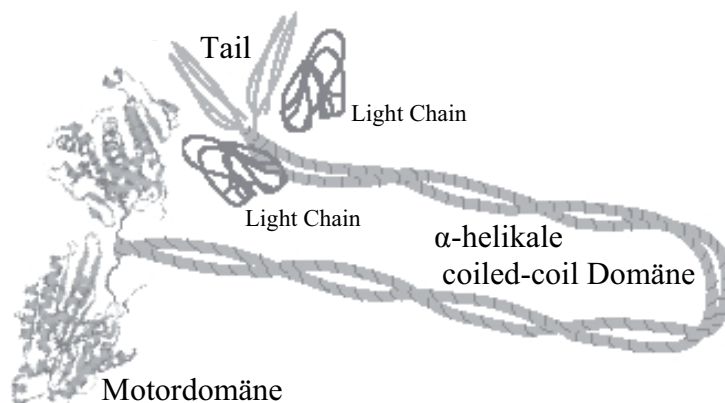
Obwohl die Proteinkinase CK2 vor über 50 Jahren zum ersten Mal beschrieben wurde, ist sie noch heute ein Untersuchungsobjekt zahlreicher Arbeitsgruppen auf der ganzen Welt. Sie ist bekannt als eine evolutionär hoch konservierte, ubiquitär vorkommende Serin/Threoninkinase, welche in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist. Man kennt über 300 verschiedene Substrate aus den unterschiedlichsten Zellkompartimenten, die von ihr phosphoryliert und so reguliert werden können (Pinna & Meggio, 1997; 2003). Doch gerade diese Substratvielfalt macht es besonders schwer, Aussagen über eine *in vivo* Funktion der Proteinkinase CK2 zu treffen, da ihre Substrate in nahezu allen Zellprozessen involviert sind. Die Identifikation von Proteinen, die eine Bindung mit der CK2 eingehen können, erscheint als ein viel versprechender Ansatzpunkt, die Funktion der CK2 zu erforschen. Man hofft durch eine Interaktion der CK2 mit ihren Bindungspartnern den möglichen Ort und die Qualität in Bezug auf die Funktion der Kinase näher zu charakterisieren. Durch die Identifikation von CK2-Bindungspartnern konnten in kurzer Zeit eine große Anzahl an Interaktionspartnern wie Wachstumsfaktoren, nukleäre und nukleoläre Proteine, cytoskeletale und virale Proteine identifiziert werden (Guerra & Issinger, 1999). Dies ist jedoch darauf zurückzuführen, dass die Proteinkinase CK2 auch mit ihren Substraten eine Bindung eingehen kann, welche bedeutend fester ist als bei einer normalen Enzym-Substrat-Interaktion (Glover, 1998). Mit Hilfe der Identifikation von CK2-Interaktionspartnern konnte jedoch die Existenz von freien katalytischen und regulatorischen Untereinheiten bewiesen werden. Eine Tatsache, die das Verständnis der Proteinkinase CK2 revolutionierte, da man bis dato annahm, die CK2 würde in der Zelle immer als heterotetrameres Holoenzym existieren. Durch diese Interaktionsstudien konnte weiterhin gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Untereinheiten spezifisch mit Proteinen interagieren können, ohne auf ein Vorhandensein des Holoenzym angewiesen zu sein. Ein Beispiel einer solchen spezifischen Interaktion zwischen der Proteinkinase CK2 und eines Bindungspartners ist das Tumorsuppressorprotein p53. So konnte sowohl eine exklusive Bindung von p53 an die CK2 $\beta$ -Untereinheit nachgewiesen (Herrmann *et al.*, 1991; Filhol *et al.*, 1992), als auch eine Beeinflussung der enzymatischen Aktivität der CK2 und der transaktivierenden Fähigkeit von p53 beobachtet werden (Schuster *et al.*, 1999; 2001). Auch für die katalytischen CK2-Untereinheiten wurden bereits Bindungspartner beschrieben, die für ihre Assoziation kein Holoenzym benötigen, so zum Beispiel das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) (Miayata & Yahara, 1995) und Nucleolin (Li *et*

*al.*, 1996; 1999). Die Suche nach spezifischen Interaktionspartnern für die katalytischen Untereinheiten gestaltet sich auf Grund ihrer hohen Sequenzhomologie bedeutend schwerer. Trotzdem gelang es sowohl für die CK2 $\alpha$ - als auch für die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit spezifische Interaktionspartner zu identifizieren. So wurde das „CK2 interacting protein“ (CKIP-1) als Interaktionspartner für die CK2 $\alpha$  beschrieben (Bosc *et al.*, 2000). Durch diese Interaktion wird CK2 $\alpha$  an die Plasmamembran der Zelle rekrutiert, die Bedeutung dieser Rekrutierung konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden (Olsten *et al.*, 2004). Auch konnte mit der Superoxiddismutase-1 (SOD-1) ein erstes Protein identifiziert werden, dass exklusiv an die CK2 $\alpha'$  bindet (Abramsczyk *et al.*, 2003). Eine Interaktion dieser beiden Proteine führt zu einer Inhibition der Kinaseaktivität der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit. Doch auch hier ist die Bedeutung der Inhibition nicht endgültig geklärt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass weitere spezifische Bindungspartner für die katalytischen CK2-Untereinheiten existieren. So führt eine Deletion der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit in Mäusen zu Infertilität und einer Spermienfehlbildung der männlichen Nachkommen (Xu *et al.*, 1999; Escalier *et al.*, 2003), wohingegen eine Deletion der CK2 $\alpha$  zu keinem lebensfähigen Organismus führt (Lou *et al.*, 2008). Man nimmt daher an, dass die CK2 $\alpha$ - und die CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben können.

Eine inzwischen häufig angewandte Methode, um spezifische Interaktionspartner für Proteine zu identifizieren, ist das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Diese Form der Untersuchung erlaubt es in kurzer Zeit eine Vielzahl von möglichen Bindungspartnern sensitiv zu detektieren, welche im Anschluss eingehenden Studien unterzogen werden können. Des Weiteren besitzt das Hefe-Zwei-Hybrid-System den Vorteil gegenüber von *in vitro* Methoden wie beispielsweise „pull-down“-Untersuchungen, dass Protein-Protein-Wechselwirkungen in eukaryonten Zellen untersucht werden können, wodurch der mögliche Einfluss von posttranslationalen Modifikationen berücksichtigt wird. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems, bei dem eine humane Testis-cDNA-Bank nach Interaktionspartnern für die katalytischen CK2-Untereinheiten durchsucht wurde (Kaul, 2003), konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits das Sperma- und Hoden-spezifische Protein TNP1 und der am Insulinstoffwechsel beteiligte Transkriptionsfaktor PDX-1 (Pancreas-duodenum-homeobox-protein-1) identifiziert werden (Lehnert, 2006). Des Weiteren konnte mit der Identifikation des RNA-Spleiß-Faktors hPrp3p eine Beteiligung der Proteinkinase CK2 am Spleiß-Prozess gezeigt werden (Lehnert *et al.*, 2007).

Das neuronale Motorprotein KIF5C wurde ebenfalls im Rahmen einer Aufarbeitung der von G. Kaul (2003) durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung als Interaktionspartner für die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2 identifiziert. KIF5C gehört zusammen mit seinen beiden Familienmitgliedern KIF5A und KIF5B zur Kinesin-Gruppe-1, den schweren Ketten (Kinesin Heavy Chains, KHC) des konventionellen Kinesins. Beim konventionellen Kinesin handelt es sich um ein Heterotetramer bestehend aus zwei Heavy und zwei Light Chains (Abb. 49). Das Kinesin Heavy Chain-Protein lässt sich in zwei Domänen unterteilen: die Motordomäne mit der Mikrotubuli-Bindungsregion und der ATPase-Aktivität zur Generierung der Bewegung und die Nicht-Motordomäne mit der Bindungsstelle für die Light Chains oder für andere zu transportierende Proteine. Kinesin-1 wurde erstmals identifiziert im Axoplasma von Tintenfischen sowie in bovinem Gehirn (Brady, 1985; Vale *et al.*, 1985) und stellte das erste Mitglied der Kinesin-Superfamilie (KIF) dar.

### Kinesin-1 Heterotetramer



**Abbildung 49:** Schematische Darstellung des konventionellen Kinesin-1 Heterotetramers (Quelle: The Kinesin Homepage), bestehend aus zwei Kinesin Heavy Chain- Dimeren und zwei Kinesin Light Chains (Yang, 1989).

Bei den Kinesinen handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die Mikrotubuli als Schienen nutzen, um sich fortzubewegen. Sie bilden zusammen mit Dynein, welches ebenfalls Mikrotubuli zur Fortbewegung nutzt und Myosin, das sich entlang der Actinfilamente bewegt, die Gruppe der cytoskeletalen Motorproteine. Diese Gruppe besitzt eine katalytische Motordomäne, die durch zwei Bindungsregionen charakterisiert ist: eine Bindungsregion für ATP und eine Bindungsregion für die cytoskeletale Schiene (Yang, 1990). Nach der Bindung von ATP an die Motordomäne von Kinesin erfolgt eine ATP-Hydrolyse, welche den Energie-liefernden Schritt für die Fortbewegung entlang der

Mikrotubuli darstellt. Diese Fortbewegung geht einher mit einer Konformationsänderung der schweren Ketten des Kinesins, die in Form einer „Hand-over-Hand“-Bewegung an den Mikrotubuli resultiert (Schief & Howard, 2001). Mit Hilfe dieser Bewegung kann Kinesin gebundenes Transportgut (z.B. Vesikel, Mitochondrien) innerhalb der Zelle transportieren. Die schweren Ketten der Kinesine sind für den schnellen Transport von Molekülen vom Zellkern zur Zellperipherie (anterograder Transport), das Mikrotubuli assoziierte Dynein hingegen als „Antagonist“ für den langsamen Transport zum Zellkern (retrograder Transport) verantwortlich, obwohl sich Dynein auch in anterograder Richtung fortbewegen kann (Hollenbeck & Chapman, 1986; Hirokawa *et al.*, 1990).

KIF5C wurde in der vorliegenden Arbeit für eingehende Interaktionsuntersuchungen gewählt, da es sich um ein nervenspezifisches Motorprotein handelt, das vor allem in Motorneuronen verstärkt exprimiert wird (Kanai *et al.*, 2000). Die Proteinkinase CK2 ist eine Phosphotransferase, die im Gehirn eine große Rolle spielt. So konnte die höchste Kinaseaktivität der CK2 in Gehirn und Testes gemessen werden (Nakajo *et al.*, 1986; Krebs *et al.*, 1988). Diese Aktivität ist in allen untersuchten Gehirnregionen wie zum Beispiel dem Hippocampus, dem Caudate putamen und dem Cortex detektierbar (Girault *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990). Es konnte auch gezeigt werden, dass die CK2 eine Rolle bei der Langzeit-Potenzierung spielt, einem Prozess der wichtig für das Lernen und die Erinnerung ist (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1991). So ist die CK2-Aktivität hier deutlich gesteigert, wohingegen Alzheimer-Patienten eine Minderung in der CK2-Expression zeigen (Aksenova *et al.*, 1991). Zusätzlich sind viele cytoskeletale Proteine bekannt, die sowohl von der CK2 phosphoryliert werden als auch mit ihr interagieren können. Ein solches Protein ist beispielsweise das Tubulin, welches von der CK2 phosphoryliert wird (Serrano *et al.*, 1987; Crute & van Burskirk, 1992) und mit der CK2 über ihre katalytischen Untereinheiten interagieren kann (Faust *et al.*, 1999). Daher bestand die Überlegung, dass KIF5C als cytoplasmatisches Protein im Gehirn eventuell einen Einfluss auf die Aktivität der CK2 oder dass eine Interaktion der Proteinkinase CK2 einen möglichen Effekt auf die Aktivität des Motorproteins KIF5C ausüben könnte. Zusätzlich bestand die Hoffnung, einen neuen spezifischen Interaktionspartner für die katalytischen CK2-Untereinheiten zu identifizieren.

Zur genaueren Kartierung der Interaktionsstelle auf dem KIF5C Volllängenprotein wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung mit KIF5C-Fragmenten durchgeführt. Zusätzlich wurde eine mögliche Interaktion von KIF5C mit der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit untersucht. Es konnte



gezeigt werden, dass die Motordomäne von KIF5C (Aminosäure 1 - 335) sowohl mit der CK2 $\alpha$ - als auch mit der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit interagiert. Eine Reaktion der katalytischen CK2-Untereinheiten mit der Nicht-Motordomäne (Aminosäure 336 - 957) von KIF5C, die für den Transport von Vesikeln innerhalb der Zelle verantwortlich ist, konnte hingegen nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Proteinkinase CK2 nicht direkt von KIF5C innerhalb der Zelle transportiert wird. Auf Grund der etwa 80%igen Sequenzhomologie der Motordomänen innerhalb der drei Kinesin-1 Familienmitglieder (Kanai *et al.*, 2000) könnte man jedoch nicht nur eine Assoziation von KIF5C mit der CK2, sondern auch von dem ubiquitären KIF5B und dem neuronspezifischen KIF5A vermuten und somit einer generellen Assoziation dieser Motorproteine mit der Proteinkinase CK2.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass KIF5C nur von Zellen neuronalen Ursprungs, wie z.B. der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und der murinen motorneuronalen Zelllinie NSC34 exprimiert wird. In sämtlichen weiteren untersuchten Zelllinien wie Nieren-, Prostata- oder Colonzelllinien konnte KIF5C nicht nachgewiesen werden. Ein Vergleich der KIF5C Expression zwischen den beiden neuronalen Zellen, zeigte eine deutlich stärkere Proteinexpression in SH-SY5Y Zellen, so dass sämtliche folgenden Untersuchungen in dieser Zelllinie durchgeführt wurden. Somit wird KIF5C nur in hoch spezialisierten Zellen exprimiert, was auf eine besondere Bedeutung dieses Proteins hinweist.

Eine Interaktion im Hefe-Zwei Hybrid-System sollte immer nur als ein Ausgangspunkt zur Untersuchung einer Proteininteraktion gewertet werden. So erlaubt das Hefe-Zwei-Hybrid-System zwar die Interaktion *in vitro* sehr sensitiv zu bestimmen, *in vivo* kann es jedoch sein, dass die identifizierten Interaktionspartner in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorliegen und somit eine Bindung unmöglich ist. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass KIF5C in einem Sucroседichtegradienten der Cytoplasmafraktion von SH-SY5Y Zellen in den gleichen Fraktionen sedimentiert wie die einzelnen Untereinheiten der Proteinkinase CK2. Dies bedeutet einerseits, dass sämtliche CK2 Untereinheiten im Cytoplasma von SH-SY5Y Zellen detektiert werden können und andererseits, dass KIF5C mit der Proteinkinase CK2 komplexiert im Cytoplasma vorliegen könnte. Eine Koimmunpräzipitations-Analyse der Fraktionen, in denen KIF5C zuvor sedimentiert war, konnte zeigen, dass an einem KIF5C-Immunpräzipitat eine Kinaseaktivität mit Hilfe eines synthetischen Substratpeptids messbar war. Dieses Peptid wird als spezifisches Substrat für die Proteinkinase CK2 beschrieben (Kuenzel *et al.*, 1985). Das Ergebnis war somit ein erster Anhaltspunkt dafür, dass KIF5C mit

der CK2 assoziiert vorliegt. Es zeigte sich weiterhin, dass diese Kinaseaktivität nach Zugabe des spezifischen CK2-Inhibitor TBB (Sarno *et al.*, 2001) deutlich gemindert wird. Dies bedeutet, dass KIF5C entweder direkt oder komplexiert mit der Proteinkinase CK2 im Cytoplasma von SH-SY5Y Zellen vorliegt. Jedoch konnte durch dieses Experiment nicht festgestellt werden, ob nur die einzelnen katalytischen CK2-Untereinheiten oder ein CK2-Holoenzym mit KIF5C kopräzipitiert.

Nachdem mit der humanen Zelllinie SH-SY5Y ein Zellsystem identifiziert werden konnte, dass sowohl KIF5C als auch die einzelnen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 exprimiert, wurden Kolokalisations-Untersuchungen zu KIF5C und der CK2 in undifferenzierten und durch Retinsäure differenzierten Zellen durchgeführt. Eine Veröffentlichung von Diaz-Nido *et al.* aus dem Jahr 1992 konnte zeigen, dass die Proteinkinase CK2 in der Neuroblastomlinie NIA-103 nach einer Differenzierung durch Serumentzug und einer Behandlung mit einem DNA-Syntheseschmitter ein cytoplasmatisches Lokalisationsmuster aufweist. In nicht differenzierten Zellen hingegen kann die CK2 fast ausschließlich im Nukleus detektiert werden. Ausgehend von dieser Beobachtung folgte die Arbeitsgruppe, dass eine Translokation der Proteinkinase CK2 vom Zellkern ins Cytoplasma bei differenzierten Neuroblastomzellen für die Regulation der Morphogenese verantwortlich ist. Diese Lokalisationsänderung der CK2 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Vielmehr zeigte die katalytische CK2 $\alpha$ -Untereinheit sowohl in differenzierten als auch in undifferenzierten SH-SY5Y Zellen ein dominant nukleäres Lokalisationsmuster. Das cytoplasmatische Signal war deutlich schwächer ausgeprägt. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die katalytische CK2 $\alpha$ -Untereinheit in Tumorzellen meist eine nukleäre Lokalisation aufweist (Krek *et al.*, 1992). Daher konnte nur eine recht schwache Kolokalisation der CK2 $\alpha$  mit KIF5C als cytoplasmatisches Protein detektiert werden. Eine weitaus deutlichere Kolokalisation von KIF5C konnte in einer Koimmunfluoreszenz-Analyse mit der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit beobachtet werden. Sowohl in differenzierten als auch in undifferenzierten SH-SY5Y Zellen konnte die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit deutlich im Cytoplasma detektiert werden. Diese Beobachtung könnte als Anhaltspunkt für den funktionellen Unterschied zwischen CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheit angesehen werden.

Bei der Wahl der geeigneten Zelllinie zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation, sollte man jedoch immer beachten, dass sich ein Großteil der in Kultur befindlichen Zellen deutlich von primären Zellen unterscheidet. So sind die meisten Kulturzellen durch virale Proteine

oder andere transformierende Faktoren soweit verändert, dass sie auf der Ebene der Proteinexpression, des Wachstumsverhaltens oder auf Genebene nur noch wenig mit Primärzellen gemeinsam haben. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation nicht nur auf die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y zurückgegriffen, sondern es wurden zusätzlich Koimmunfluoreszenz-Analysen an primären Neuronen aus dem Hippocampus von Mäusen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit ausschließlich im Cytoplasma der Neuronen zu detektierbar ist. Dort konnte auch eine deutliche Kolokalisation mit KIF5C beobachtet werden. Diese Kolokalisation konnte zwar auch für die beiden anderen CK2-Untereinheiten bestätigt werden, jedoch war hier erneut ein starkes nukleäres Signal für die CK2 $\alpha$ - und CK2 $\beta$ -Untereinheit zu erkennen. Die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit konnte im Zellkern von hippocampalen Neuronen nicht detektiert werden. Somit spricht auch diese Untersuchung für einen Unterschied zwischen den katalytischen CK2-Untereinheiten in Bezug auf ihre funktionelle Bedeutung innerhalb der Zelle. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Lokalisation unterstützt Untersuchungen zur CK2-Expression und Lokalisation im Gehirn, in denen gezeigt wurde, dass die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit in Neuronen stärker exprimiert wird als in Gliazellen (Diaz-Nido *et al.*, 1994).

Es ist bekannt, dass die Aktivität der Proteinkinase CK2 vor allem während der embryonalen Entwicklung und der frühen post-natalen Phase deutlich erhöht ist. Nach diesem Zeitraum lässt sich eine leichte Abnahme der Aktivität feststellen (DeCamilli & Greengard, 1986). Es konnte auch gezeigt werden, dass die CK2 $\alpha$ -Untereinheit in der frühen Phase der Gehirnentwicklung detektierbar ist, wohingegen die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit in bereits ausgereiften Neuronen verstärkt vorliegt (Diaz-Nido *et al.*, 1994). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hippocampusneurone wurden aus neugeborenen oder einen Tag alten Mäusen extrahiert. Sie repräsentieren die frühe post-natale Phase. Daher wurde die Untersuchung zur subzellulären Lokalisation der Proteinkinase CK2 und von KIF5C an Gewebeschnitten von erwachsenen Mäusen durchgeführt. Da KIF5C verstärkt in Motoneuronen exprimiert wird, wurden als Untersuchungsobjekte Rückenmark-Präparationen von 3 bis 4 Monate alten Mäusen gewählt. Einzelimmunfluoreszenz-Untersuchungen ergaben, dass ein Großteil der Fluoreszenzen der CK2-Untereinheiten im Cytoplasma der untersuchten Rückenmark-Neurone detektierbar ist. Innerhalb des Zellkerns kann nur ein geringer Anteil der CK2-Untereinheiten detektiert werden. Eine Doppelimmunfluoreszenz-Analyse zeigte, dass KIF5C mit sämtlichen CK2-Untereinheiten

kolokalisiert vorliegt. Von Diaz-Nido *et al.* konnte 1994 gezeigt werden, dass speziell die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit in großen Neuronen verstärkt vorkommt. Doch im Falle der hier untersuchten Motoneurone, die die längsten Neurone innerhalb des Organismus repräsentieren, konnte durch eine Immunfluoreszenz-Untersuchung keine Dominanz einzelner CK2-Untereinheiten im Cytoplasma detektiert werden. Somit scheint die Proteinkinase CK2 als prädominant cytoplasmatische Proteinkinase in Motoneuronen vorzuliegen. Gestützt wird diese Beobachtung durch subzelluläre Fraktionierungsanalysen, die zeigten, dass die Hälfte der totalen CK2-Aktivität im Cytosol und etwa ein Drittel der Aktivität in der synaptosomalen Fraktion gemessen werden konnte (Girault *et al.*, 1990).

Bei einer Untersuchung zur Kolokalisation von Proteinen mit Hilfe der Immunfluoreszenz muss man aber beachten, dass eine gemeinsame Lokalisierung nicht gleichbedeutend ist mit einer Assoziation dieser Proteine. So können sich Proteine an der gleichen Stelle innerhalb einer Zelle befinden, ohne dass sie jedoch aneinander binden. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Kaninchenserum hergestellt werden, das spezifisch gegen KIF5C gerichtet ist und allen Qualitätsansprüchen eines funktionellen Antikörpers entspricht. Mit Hilfe dieses spezifischen Serums konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass KIF5C mit sämtlichen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 aus SH-SY5Y Zellen kopräzipitiert werden kann. Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, kann man annehmen, dass KIF5C entweder in einem Komplex mit der CK2 vorliegt oder direkt mit ihr assoziiert ist.

Um eine mögliche Bindung von KIF5C mit einzelnen CK2-Untereinheiten oder dem CK2-Holoenzym genauer zu untersuchen wurde eine Koimmunpräzipitation-Analyse mit bakteriell exprimierten, gereinigten Proteinen durchgeführt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nur die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit an KIF5C bindet. Man kann weder eine Assoziation der CK2 $\alpha$ - oder CK2 $\beta$  noch des CK2-Holoenzym detektieren. Zwar steht dieses Ergebnis nicht in Einklang mit den Ergebnissen der Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung, bei dem auch die CK2 $\alpha$  als Interaktionspartner von KIF5C bestimmt wurde, jedoch könnte die Identifikation von CK2 $\alpha$  auf die hohe Homologie der beiden katalytischen Untereinheiten zurückzuführen sein. Möglicherweise spielen auch posttranslationale Modifikationen bei dem im Hefe-Zwei-Hybrid-System erhaltenen Ergebnis eine Rolle. Betrachtet man die Ergebnisse der *in vitro* Koimmunpräzipitations-Untersuchungen zusammen mit den zuvor durchgeführten Analysen, so ergibt sich eine Assoziation des neuronalen Motorproteins KIF5C mit der Proteinkinase CK2 über deren katalytische CK2 $\alpha'$ -Untereinheit. KIF5C wäre somit neben der

Superoxiddismutase 1 (Abramsczyk *et al.*, 2003) der zweite CK2 $\alpha'$ -spezifische Interaktionspartner.

Der Fluoreszenz oder Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) ist eine inzwischen häufig verwendete Methode, Interaktionen von Molekülen *in vivo* mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie zu untersuchen. So können mit Hilfe von FRET-Messungen z.B. Aussagen über die räumliche Entfernung zweier Proteine zueinander getroffen werden (Stryer, 1978; Piston & Kremers, 2007). In der Veröffentlichung von Smith *et al.*, 2006 konnte mittels der FRET-Analyse eine Interaktion zwischen KIF5C und dem Gamma-aminobutyric acid, type A receptor interacting factor-1 (GRIF-1) gezeigt werden. Durch diese FRET-Messungen war es sogar möglich, den Ort der Interaktion auf die Nicht-Motordomäne einzugrenzen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Interaktion von KIF5C mit den katalytischen  $\alpha$ - und  $\alpha'$ -Untereinheiten durch eine FRET-Untersuchung näher zu charakterisieren. Auch sollte, wenn möglich, die Motordomäne von KIF5C als spezifischer Ort der Interaktion mit den katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 bestätigt werden. Nach der Transfektion der drei FRET-Konstrukte (KIF5C Volllänge, KIF5C Motordomäne und KIF5C Nicht-Motordomäne) in COS-1 Zellen konnte im Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet werden, dass die Motordomäne von KIF5C vor allem innerhalb des Nukleus zu detektieren ist, wohingegen die Nicht-Motordomäne und das KIF5C Volllängenprotein eine cytoplasmatische Verteilung aufweisen. Da es sich bei den Motorproteinen der Kinesin-1 Familie jedoch um Proteine handelt, die im Cytoplasma von Zellen lokalisiert sind, konnte für die FRET-Untersuchungen nur das Volllängenprotein berücksichtigt werden. Eine Kotransfektion der CFP-gekoppelten, katalytischen CK2-Untereinheiten mit dem YFP-gekoppelten KIF5C Volllängenprotein wurde in dieser Arbeit einer FRET-Messung durch das YFP-Bleichen unterzogen. So konnte für KIF5C und die CK2 $\alpha$ -Untereinheit eine relative FRET-Effizienz von 8%, für KIF5C und CK2 $\alpha'$  eine relative FRET-Effizienz von 14% gemessen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich KIF5C näher bei CK2 $\alpha'$  als bei CK2 $\alpha$  befindet. Man muss jedoch bedenken, dass nur bei einer sehr geringen Anzahl der kotransfizierten Zellen eine relative FRET-Effizienz bestimmt werden konnte. Dieses Ergebnis könnte möglicherweise auf die Lokalisation der CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten zurückzuführen sein. Untersuchungen mit fluoreszenz-markierten CK2-Untereinheiten konnten zeigen, dass sowohl die CK2 $\alpha$ - als auch die CK2 $\beta$ -Untereinheiten nicht statisch innerhalb einer Zelle lokalisiert sind, sondern vielmehr dynamisch vom Cytoplasma in den Zellkern und zurück wandern können (Martel *et al.*, 2001). Diese Analysen zeigten weiterhin, dass sich die beiden CK2-Untereinheiten nach

ihrer Transfektion vor allem während der Interphase des Zellzyklus im Zellkern befinden. Erst zu Beginn der Mitose und der Kondensation der Chromosomen konnten CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$  deutlich im Cytoplasma detektiert werden. Die vorliegende Arbeit zeigt anhand von Koimmunfluoreszenz-Untersuchungen, dass sämtliche Untereinheiten der Proteinkinase CK2 deutlich im Cytoplasma von Neuronen lokalisiert werden können. Auch in murinen Embryofibroblasten konnte die Konzentration der katalytischen Untereinheiten im Cytoplasma beobachtet werden (Faust *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse stehen jedoch nicht in Einklang mit der subzellulären Lokalisation der mit ECFP-CK2 $\alpha$  oder ECFP-CK2 $\alpha'$  transfizierten Zellen. Somit scheint die Transfektion von CFP-gekoppelten CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten nicht einen *in vivo* Lokalisationsstatus wiederzuspiegeln. Aus diesen Ergebnissen könnte sich die Vermutung ableiten lassen, dass eine FRET-Messung zur Bestimmung der räumlichen Nähe zwischen KIF5C oder anderen cytoplasmatischen Proteinen und den katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 nur eine beschränkte Aussagekraft besitzt.

Es ist bekannt, dass die Proteinkinase CK2 zahlreiche cytoskeletale Proteine phosphorylieren kann. So wurden bereits das tau-Protein (Greenwood *et al.*, 1994),  $\beta$ -Tubulin (Serrano *et al.*, 1987; Crute & van Burskirk, 1992), MAP-1B (Allende & Allende, 1995) und Dynein (Karki *et al.*, 1997) als Substrate für die CK2 identifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass KIF5C ein Substrat für die Proteinkinase CK2 *in vitro* darstellt. So konnten Sato-Yoshitake *et al.*, 1992 bereits zeigen, dass Kinesin von der Proteinkinase A *in vitro* phosphoryliert wird. Genauere Untersuchungen ergaben jedoch keine *in vivo* Phosphorylierung von Kinesin durch die Proteinkinase A (Hollenbeck, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass KIF5C auch *in vivo* durch die CK2 phosphoryliert wird. Da *in vitro* keine Assoziation von KIF5C mit dem CK2-Holoenzym festzustellen ist, spricht diese Beobachtung für eine reine Enzym-Substrat-Interaktion. Weiterhin wurde KIF5C als *in vitro*-Substrat für die CK2 $\alpha'$ -, nicht jedoch für die CK2 $\alpha$ -Untereinheit identifiziert. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, da nur wenige Proteine bekannt sind, die auch von den freien katalytischen CK2-Untereinheiten alleine phosphoryliert werden können. Zusammengenommen mit der Beobachtung, dass KIF5C mit der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit auch kopräzipitiert werden kann, könnte hier eine Assoziation über eine Enzym-Substrat-Interaktion hinausgehen.

Zur Untersuchung möglicher Phosphorylierungen von KIF5C durch die Proteinkinase CK2 wurden zu einer ersten Kartierung rekombinante KIF5C-Fragmente hergestellt. Eine solche Grobkartierung sollte die potentiellen Phosphorylierungsstellen auf einen Teilbereich von KIF5C einschränken. Als Teilfragmente wurden die Motordomäne von Aminosäure 1 bis 335 mit der ATPase-Funktion von KIF5C und die Nicht-Motordomäne von Aminosäure 336 bis 957 gewählt. Durch eine *in vitro* Kinasereaktion konnte der Bereich möglicher Phosphorylierungen auf die Nicht-Motordomäne begrenzt werden. Es handelt sich hierbei jedoch um einen 600 Aminosäure langen Teilbereich der Polypeptidkette von KIF5C und genaue Aussagen zur Anzahl der Phosphorylierungsstellen waren durch diese Methode nicht zu treffen. Mit Hilfe von Peptidfiltern, auf welche mögliche CK2-Phosphorylierungsstellen aufgespottet werden, konnten bereits die Phosphorylierungsstellen von Cyclin H bestimmt werden (Schwindling *et al.*, 2004). Daher wurde im Folgenden die Polypeptidkette von KIF5C mit Hilfe des im Internet erhältlichen ExPASy-Programmes nach möglichen CK2-Phosphorylierungsstellen abgesucht. Dieser Suche lag die minimale Konsensussequenz S/T-x-x-E/D einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase CK2 zu Grunde (Meggio *et al.*, 1994; Songyang *et al.*, 1996). Es konnten 19 mögliche CK2-Phosphorylierungsstellen detektiert werden, die im Folgenden als Dekapeptide auf Whatman-Filter aufgespottet wurden. Durch eine *in vitro* Kinasereaktion konnte nur eine einzige Phosphorylierungsstelle innerhalb von KIF5C identifiziert werden: die Aminosäure Threonin 338. Zusätzlich konnte durch das Kontrollexperiment mit radioaktivem ATP eine Bindung von ATP an die möglichen Phosphorylierungsstellen von KIF5C ausgeschlossen werden. Die Identifikation von Threonin 338 war zwar verwunderlich, da Untersuchungen ergaben, dass Kinesin *in vivo* nur an Serinen phosphoryliert wird (Hollenbeck, 1993), trotzdem wurde diese Aminosäure in Bezug auf ihre Phosphorylierung durch die CK2 genauer untersucht. Zur Bestätigung, dass Threonin 338 die einzige Phosphorylierungsstelle innerhalb von KIF5C ist, wurde diese Aminosäure zu Alanin und Aspartat mutagenisiert. Bei Alanin handelt es sich um eine unpolare Aminosäure, welche nicht von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert werden kann. Aspartat hingegen ist eine polare Aminosäure, die den Status einer Phosphorylierung imitiert. Somit sollte in einer *in vitro* Kinasereaktion keine Phosphorylierung der KIF5C-Mutanten detektierbar sein. Nach der Herstellung der Mutanten und der Untersuchung in einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit der Proteinkinase CK2 konnte festgestellt werden, dass KIF5C als Protein mit Wildtyp-Aminosäuresequenz phosphoryliert wird. Jedoch werden auch die Mutanten phosphoryliert. Somit kann man davon ausgehen, dass es sich bei Threonin 338 um eine *in vitro* Phosphorylierungsstelle der CK2 handelt. Durch die Phosphorylierung der beiden Mutanten,

muss man jedoch davon ausgehen, dass diese Aminosäure nicht die einzige Phosphorylierungsstelle innerhalb von KIF5C ist, die *in vitro* von der CK2 phosphoryliert wird. Es ist zu beachten, dass es sich bei der Untersuchung von Phosphorylierungsstellen mit Hilfe von Peptidfiltern nur um jeweils 10 Peptide des 957 Aminosäure langen KIF5C handelte. Somit konnten beispielsweise Einflüsse durch eine Proteinfaltung nicht berücksichtigt und möglicherweise weitere Phosphorylierungsstellen innerhalb von KIF5C nicht detektiert werden.

Eine mögliche Funktion einer Assoziation von KIF5C mit der Proteinkinase CK2 könnte in einer Veränderung der Aktivität der CK2 resultieren. Eine solche Funktion wurde bereits für die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit beschrieben, deren Assoziation mit den katalytischen Untereinheiten zu einer Modulation der CK2-Aktivität führt (Grankowski *et al.*, 1991). Weiterhin ist bekannt, dass eine Bindung des Wachstumssuppressorproteins p53 mit der Proteinkinase CK2 in einer Inhibierung der Kinaseaktivität resultiert (Schuster *et al.*, 2001). Auch konnte kürzlich das Protein hPrp3p als ein neuer Interaktionspartner für die CK2 identifiziert werden, der spezifisch an die katalytischen Untereinheiten bindet (Lehnert *et al.*, 2007). Hier konnte gezeigt werden, dass hPrp3p zwar keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität des Holoenzym ausübt, eine Bindung an die freie CK2 $\alpha$ -Untereinheit hingegen deren spezifische Aktivität deutlich inhibiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von KIF5C keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität eines CK2-Holoenzym ausübt. Diese Beobachtung bestätigt das Vorliegen einer reinen Enzym-Substrat-Interaktion zwischen KIF5C und der Proteinkinase CK2, da sich auch *in vitro* keine Assoziation der beiden Proteine feststellen lässt. Die Bindung von KIF5C an die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit hingegen führt zu einer Reduktion der Kinaseaktivität. Da CK2 $\alpha'$  die einzige Untereinheit der Proteinkinase CK2 darstellt, die *in vitro* mit KIF5C kopräzipitiert, könnte die Reduktion der Kinaseaktivität die funktionelle Konsequenz für CK2 $\alpha'$  sein und somit auf eine Regulation von CK2-Subpopulationen hindeuten. Auch bei der Bindung der SOD-1 an CK2 $\alpha'$  konnte eine Abnahme der spezifischen Kinaseaktivität beobachtet werden (Abramczyk *et al.*, 2003). Jedoch konnte auch hier die funktionelle Bedeutung nicht eindeutig geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur der Einfluss von KIF5C auf die Kinaseaktivität der CK2 sondern auch der Einfluss der artifiziell erzeugten Mutationen auf die der KIF5C eigenen ATPase-Aktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bakteriell exprimiertes KIF5C als Protein mit der Wildtyp-Aminosäuresequenz den größten ATP-Umsatz pro



Zeiteinheit aufweist. Sowohl die Alanin-Mutante als auch die Aspartat-Mutante hydrolysieren weniger ATP pro Zeiteinheit. Interessanterweise zeigt sich der geringste ATP-Umsatz bei KIF5C, welches in Insektenzellen exprimiert wurde und somit im Gegensatz zu bakteriell exprimiertem KIF5C, posttranslationale Modifikationen besitzt. Somit scheint die Aminosäure T338 eine bedeutende Rolle für die Funktionalität von KIF5C zu spielen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich posttranslationale Modifikationen inhibierend auf die ATPase-Aktivität von KIF5C auswirken. Die Aminosäure Threonin 338 in der Polypeptidkette von KIF5C liegt innerhalb der „Hinge“-Region einer  $\alpha$ -helikalen coiled-coil Domäne, die als „Genick“ bezeichnet wird. Das Genick bildet die Verbindung zwischen der katalytischen Motordomäne („Kopf“) und der Nicht-Motordomäne („Stiel“). Diese Domäne ist verantwortlich für die Dimerisierung zweier schwerer Ketten, welche für die Fortbewegung von Kinesin-1 entlang der Mikrotubuli von essentieller Bedeutung ist (Jiang *et al.*, 1997; Hancock & Howard, 1999). Zusätzlich erfolgt durch das Genick die Koordination der beiden Motordomänen, damit eine alternierende Bewegung korrekt ablaufen kann. So ist es Kinesin-1 möglich pro hydrolysiertem ATP-Molekül einen jeweils 8 nm großen Schritt an den Mikrotubuli zurückzulegen (Coy *et al.*, 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Flexibilität der Genick-Domäne von großer Bedeutung für die Funktionalität von Kinesin in Bezug auf seine Transportfähigkeit ist (Jaud *et al.*, 2006). Inwiefern sich die Phosphorylierung von Threonin 338 durch die CK2 beziehungsweise die Mutation dieser Aminosäure zu Alanin und Aspartat *in vivo* auf KIF5C auswirkt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, da auch die Bindung von Vesikeln und die Assoziation von KIF5C an Mikrotubuli einen Einfluss auf die Aktivität von Kinesin ausüben.

In der vorliegenden Arbeit konnte das neuronale Motorprotein KIF5C als ein neuer Interaktionspartner für die Proteinkinase CK2 identifiziert werden. So konnte im Besonderen die Motordomäne von KIF5C als Region einer Interaktion detektiert werden. Eine vorstellbare Konsequenz der Interaktion der KIF5C-Motordomäne mit der CK2 könnte die Regulation des von KIF5C vermittelten Organellentransports sein. Es ist bekannt, dass Kinesine für den Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich sind (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1995; Bannykh & Balch, 1998). Auch konnte eine Assoziation der CK2 sowohl mit dem Golgi-Apparat als auch mit dem ER gezeigt werden (Faust *et al.*, 2002). Da die vorliegende Arbeit zeigte, dass sich posttranslationale Modifikationen inhibierend auf die ATPase-Aktivität von KIF5C auswirken, könnte eine Phosphorylierung von KIF5C durch die CK2 in einer Modulation der

Transportfähigkeit von KIF5C resultieren. Eine andere Vorstellung zur Bedeutung der Interaktion zwischen KIF5C und CK2 könnte die Annäherung der Proteinkinase CK2 an potentielle Substrate sein. So phosphoryliert die CK2 zum Beispiel die Proteine tau (Greenwood *et al.*, 1994) und  $\alpha$ -synuclein (Ishii *et al.*, 2007), die ihrerseits von Kinesin-1 transportiert werden (Utton *et al.*, 2005). Durch eine Bindung der CK2 an die Motordomäne von KIF5C würden die Substrate so in geringere räumliche Distanz für eine mögliche Phosphorylierung gebracht werden. Es sind jedoch noch viele Untersuchungen nötig, um die biologische Konsequenz der Assoziation von CK2 und KIF5C zu klären.

Es konnten bereits viele cytoskeletale Proteine als Interaktionspartner oder Substrate für die Proteinkinase CK2 identifiziert werden, dennoch könnten weiterführende Untersuchungen zur Interaktion von KIF5C mit der CK2 interessante Einblicke in die Funktion oder Regulation der CK2 im Cytoplasma von Zellen liefern. Beispielweise zeigte eine von Lee & Hollenbeck (1995) durchgeführte Untersuchung zum Phosphorylierungsstatus von Kinesin, dass durch eine NGF-stimulierte Neuritogenese in PC-12 Zellen Kinesin *in vivo* stärker phosphoryliert und der anterograde Transport gesteigert wurde. Die Kinase, die Kinesin in diesem Fall phosphorylierte, wurde jedoch nicht genauer untersucht. Es ist aber bereits bekannt, dass NGF einen stimulierenden Einfluss auf die Proteinkinase CK2 ausübt (Kleijn *et al.*, 1998). Vielleicht könnte eine genauere Untersuchung dieser beiden beobachteten Phänomene neue Einblicke in die Funktion der CK2 als cytoskeletale Kinase liefern. Zusätzlich könnte die spezifische Interaktion zwischen KIF5C und der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit möglicherweise neue Einblicke in die funktionellen Unterschiede der beiden katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2 gewähren und vielleicht zur Klärung der Hypothese beitragen, dass die CK2 $\alpha'$ -Untereinheit bzw. ein Holoenzym bestehend aus CK2 $\alpha'$ - und CK2 $\beta$ -Untereinheiten im Gehirn die aktivste Form der CK2 darstellt (Diaz-Nido *et al.*, 1994). Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt ist die Untersuchung von KIF5C und der Proteinkinase CK2 in retinalen Neuronen des Auges. So ist bekannt, dass KIF5C auch in den Photorezeptoren des Auges lokalisiert ist, wo es mit Importin- $\beta$  interagiert und für den Proteintransport verantwortlich ist (Mavlyutov *et al.*, 2002). Auch die Proteinkinase CK2 ist in retinalen Zellen lokalisiert (Kramerov *et al.*, 2006) und scheint dort eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Cytoskeletts und der Migration des Zellkerns in neuroepithelialen Zellen zu spielen (Carneiro *et al.*, 2008). Eingehende Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von KIF5C und der Proteinkinase CK2 in der Retina werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

## 8. Literaturverzeichnis

Abramczyk O, Zień P, Zieliński R, Pilecki M, Hellman U, Szyszka R (2003) The protein kinase 60S is a free catalytic CK2 $\alpha'$  subunit and forms an inactive complex with superoxide dismutase SOD1. *Biochem Biophys Res Comm* 307: 31-40

Aksenova MV, Burbaeva GS, Kandror KV, Kapkov DV (1991) The decreased level of casein kinase-2 in brain cortex of schizophrenic and Alzheimer's disease patients. *FEBS Lett* 279: 55-7

Allende JE, Allende CC (1995) Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J* 9: 313-23

Altschul SF, Madden TL, Schäfer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman JD (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402

Antonelli M, Daniotti J, Rojo D, Allende CC, Allende JE (1996) Cloning, expression and properties of the  $\alpha'$  subunit of casein kinase from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur J Biochem* 241: 272-79

Bannykh SI, Balch WE (1998) Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments. *Histochem Cell Biol* 109: 463-75

Blanquet PR (1998) Neurotrophin-induced activation of casein kinase in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 86: 739-49

Boldyreff B, Klett C, Gottert E, Geurts van Kessel A, Hameister H, Issinger OG (1992) Assignment of casein kinase 2  $\alpha$  sequences to two different human chromosomes. *Hum Genet* 89: 79-82

Boldyreff B, James P, Staudenmann W, Issinger OG (1993) Ser2 is the autophosphorylation site in the beta subunit from bicistronically expressed human casein kinase-2 and from native rat liver casein kinase-2 beta. *Eur J Biochem* 218: 515-21

- Boldyreff B, Issinger OG (1997) A-Raf kinase is a new interacting partner for protein kinase CK2  $\beta$  subunit. *Genomics* 26: 253-256
- Bonnet H, Filhol O, Truchet I, Brethenou P, Cochet C, Amalric F, Bouche G (1996) Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin. *J Biol Chem* 271: 24781-7
- Bosc DG, Graham KC, Saulnier RB, Zhang C, Prober D, Gietz RD, Litchfield DW (2000) Identification and characterization of CKIP-1, a novel pleckstrin homology domain-containing protein that interacts with protein kinase CK2. *J Biol Chem* 275: 14295-306
- Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger OG, Boldyreff B (2003) Disruption of the regulatory  $\beta$  subunit of Protein Kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 23: 908-915
- Brady ST (1985) A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 317: 73-75
- Burnett G, Kennedy EP (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* 211: 969-80
- Carneiro AC, Fragel-Madeira L, Silva-Neto MA, Linden R (2008) A role for CK2 upon interkinetic nuclear migration in the cell cycle of retinal progenitor cells. *Dev Neurobiol* (Epub ahead of print)
- Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP (1992) Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn* 194: 209-221
- Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda A, Benitez MJ, Chambaz EM, Cochet C, Dideberg O (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J* 18: 2930-40

- Charriaut-Marlangue C, Otani S, Creuzet C, Ben-Ari Y, Loeb J (1991) Rapid activation of hippocampal casein kinase II during long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci* 88: 10232-36
- Chen M, Li D, Krebs EG, Cooper JA (1997) The casein kinase II  $\beta$  subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol* 17: 1904-12
- Coy DL, Wagenbach M, Howard J (1999) Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J Biol Chem* 274: 3667-71
- Crute BE, Van Buskirk RG (1992) A casein kinase-like kinase phosphorylates beta-tubulin and may be a microtubuli-associated protein. *J Neurochem* 59: 2017-23
- DeCamilli P, Greengard P (1986) Synapsin 1: a synaptic vesicle associated neuronal phosphoprotein. *Biochem Pharmac* 35: 4349-57
- Diaz-Nido J , Armes-Portela R, Avila J (1992) Increase in cytoplasmic casein kinase-2-type activity accompanies neurite growth after DNA synthesis. *J Neurochem* 587: 1820-28
- Diaz-Nido J, Mizuno K, Nawa H, Marshak DR (1994) Regulation of protein kinase CK2 isoform during rat brain development. *Cell Mol Biol Res* 40: 581-85
- Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG (1987) Protein serine/threonine kinases. *A Rev Biochem* 56: 567-613
- Escalier D, Silvius D, Xu X (2003) Spermatogenesis of mice lacking CK2 $\alpha$ ': failure of germ cell survival and characteristic modification of the spermatid nucleus. *Mol Reprod Dev* 66: 190-201
- Faust M, Schuster N, Montenarh M (1999) Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin. *FEBS Lett* 462: 51-56
- Faust M, Montenarh M (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res* 301: 329-40

- Faust M, Jung M, Günther J, Zimmermann R, Montenarh M (2001) Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmatic reticulum and to the Golgi apparatus. *Mol Cell Biochem* 227: 73-80
- Faust M, Günther J, Morgenstern E, Montenarh M, Götz C (2002) Specific localization of protein kinase CK2 at the centrosomes. *Cell Mol Life Sci* 59: 2155-64
- Filhol O, Baudier J, Delphin C, Loue-Mackendach P, Chambaz EM, Cochet C (1992) Casein kinase II and the tumor suppressor protein p53 associate in a molecular complex that is negatively regulated upon p53 phosphorylation. *J Biol Chem* 267: 20577-83
- Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scokaert D, Benitez MJ, Souchier C, Saoudi Y, Cochet C (2003) Live-fluorescenc imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol Cell Biol* 23: 975-87
- Gietz RD, Graham KC, Litchfield DW (1995) Interactions between the subunits of casein kinase II. *J Biol Chem* 270: 13017-21
- Girault J-A, Hemmings HC, Zorn SH, Gustafson EL, Greengard P (1990) Characterization in mammalian brain of a DARPP-32 serine kinase identical to casein kinase 2. *J Neurochem* 55: 1772-83
- Glover CV III (1998) On the physical role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59: 95-133
- Götz C, Kartarius S, Schetting S, Montenarh M (2005) Immunologically defined subclasses of protein kinase CK2  $\beta$ -subunit in prostate carcinoma cell lines. *Mol Cell Biochem* 274: 181-87
- Grankowski N, Boldyreff B, Issinger OG (1991) Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits alpha and beta from bacteria. *Eur J Biochem* 191: 111-20

- Greenwood Ja, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV (1994) Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem* 269: 4373-80
- Guerra B, Issinger OG (1999) Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* 20: 391-408
- Hackney, D (1994) Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci* 91: 6865-69
- Hagemann C, Kalmes A, Wixler V, Wixler L, Schuster T, Rapp UR (1997) The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett* 403: 200-2
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80
- Hancock WO, Howard J (1999) Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains. *Proc Natl Acad Sci* 96: 13147-52
- Hanks SK, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9: 576-96
- Hathaway GM, Lubben TH, Traugh JA (1980) Inhibition of casein kinase II by heparin. *J Biol Chem* 276: 5992-9
- Hathaway GM, Traugh JA (1982) Casein kinases multipotent protein kinases. *Curr Top Cell Regul* 21: 101-127
- Hathaway GM, Traugh JA (1983) Casein kinase II. *Methods Enzymol* 99: 317-31
- Hathaway GM, Traugh JA (1984a) Interaction of polyamines and magnesium with casein kinase II. *Arch Biochem Biophys* 233: 133-8

Hathaway GM, Traugh JA (1984b) Kinetics of activation of casein kinase II by polyamines and reversal of 2,3-bisphosphoglycerate inhibition. *J Biol Chem* 259: 7011-5

Herrman CP, Kraiss S, Montenarh M (1991) Association of casein kinase II with immunopurified p53. *Oncogene* 6: 877-84

Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Yoshida T, Kawashima (1990) Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 111: 1027-37

Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST (1991) Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 114: 295-302

Hollenbeck PJ, Chapman K (1986) A novel microtubule-associated protein from mammalian nerve shows ATP-sensitive binding to microtubules. *J Cell Biol* 103: 1539-45

Hollenbeck PJ (1993) Phosphorylation of neuronal kinesin heavy and light chains in vivo. *J Neurochem* 60: 2265-75

Ishii A, Nonaka T, Taniguchi S, Saito T, Arai T, Mann D, Iwatsubo T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M (2007) Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies. *FEBS Lett* 581: 4711-7

Jakobi R, Traugh JA (1995) Analysis of the ATP/GTP binding site of casein kinase II by site-directed mutagenesis. *Physiol Chem Phys Med NMR* 24: 293-301

Jaud J, Bathe F, Schliwa M, Rief M, Woehlke G (2006) Flexibility of the neck domain enhances kinesin-1 motility under load. *Biophys J* 91: 1407-12

Jiang W, Stock MF, Li X, Hackney DD (1997) Influence of the kinesin neck domain on dimerization and ATPase kinetics. *J Biol Chem* 272: 7626-32



Kanai Y, Okada Y, Tanaka Y, Harada A, Terada S, Hirokawa N (2000) KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J Neurosci*, 20: 6374-84

Kaul G (2003) Untersuchungen zur Regulation der Proteinkinase CK2. Dissertation, Universität des Saarlandes

Karki S, Tokito MK, Holzbaaur EL (1997) Casein kinase II binds to and phosphorylates cytoplasmic dynein. *J Biol Chem* 272: 5887-91

Kleijn M, Welsh GI, Scheper GC, Voorma HO, Proud CG, Thomas AA (1998) Nerve and epidermal growth factor induce protein synthesis and eIF2B activation in PC12 cells. *J Biol Chem* 273: 5536-41

König G, Masters CL, Beyreuther K (1990) Retinoic acid induced differentiated neuroblastoma cells show increased expression of the  $\beta$ A4 amyloid gene of Alzheimer's disease and an altered splicing pattern. *FEBS* 269: 305-10

Kramarov AA, Saghizadeh M, Pan H, Kabosova A, Montenarh M, Ahmed K, Penn JS, Chan CK, Hinton DR, Grant MB, Ljubimov AV (2006) Expression of protein kinase CK2 in astroglial cells of normal and neovascularized retina. *Am J Pathol* 168: 1722-36

Krebs EG, Eisenman RN, Kuenzel EA, Litchfield DW, Lozeman FJ, Luscher B, Sommercorn J (1988) Casein kinase 2 as a potentially important enzyme concerned with signal transduction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 53: 77-84

Krek W, Maridor G, Nigg EA (1992) Casein kinase 2 is a predominantly nuclear enzyme. *J Cell Biol* 116: 43-55

Kuenzel EA, Krebs EG (1985) A synthetic peptide substrate specific for casein kinase II. *Proc Natl Acad Sci* 83: 737-41

Kuenzel EA, Mulligan JA, Sommercorn J, Krebs EG (1987) Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J Biol Chem* 262: 9136-40

Kusk M, Bendixen C, Dunø M, Westergaard O, Thomsen B (1995) Genetic dissection of intersubunit contacts within human protein kinase CK2. *J Mol Biol* 253: 703-11

Laemmli UK (1970) cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5

Lederberg EM, Cohen SN (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 119: 1072-4

Lee KD, Hollenbeck PJ (1995) Phosphorylation of kinesin in vivo correlates with organelle association and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 270: 5600-5

Lehnert S (2006) Neue, spezifische Interaktionspartner der katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase CK2. Dissertation Universität des Saarlandes

Lehnert S, Götz C, Kartarius S, Schäfer B, Montenarh M (2007) Protein kinase CK2 interacts with the splicing factor hPrp3p. *Oncogene* (Epub ahead of print)

Leroy D, Heriché JK, Filhol O, Chambaz EM, Cochet C (1997) Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J Biol Chem* 272: 20820-7

Li D, Dobrowolska G, Krebs EG (1996) The physical association of casein kinase 2 with nucleolin. *J Biol Chem* 271: 15662-8

Li D, Dobrowolska G, Krebs EG (1999) Identification of proteins that associate with protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* 191: 223-8

Litchfield DW, Lozeman FJ, Cicirelli MF, Harrylock M, Ericsson LH, Piening CJ, Krebs EG (1991) Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *J Biol Chem* 266: 20380-9

Litchfield DW, Luscheer B, Lozeman FJ, Eisenmann RN, Krebs EG (1992) Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2 in vitro and at mitosis. *J Biol Chem* 267: 13943-51

Litchfield DW, Slominski E, Lewenza S, Narvey M, Bosc DG, Gietz RD (1996) Analysis of interactions between the subunits of protein kinase CK2. *Biochem Cell Biol* 74: 541-7

Lippincott-Schwartz J, Cole NB, Marotta A, Conrad PA, Bloom GS (1995) Kinesin Is the Motor for Microtubule-mediated Golgi-to-ER Membrane Traffic. *J Cell Biol* 128:293-306

Lou DY, Dominguez I, Toselli P, Landesman-Bollag E, O'Brien C, Seldin DC (2008) The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 28: 131-9

Marin O, Calderan A, Ruzza P, Borin G, Meggio F, Grankowski N, Marchiori F (1990) Synthetic peptides including acidic clusters as substrates of yeast casein kinase-2. *Int J Pept Protein Res* 36: 374-80

Marin O, Meggio F, Pinna LA (1994) Design and Synthesis of Two New Peptide Substrates for the Specific and Sensitive Monitoring of Casein Kinases 1 and 2. *Biochem Biophys Res Comm* 198: 898-905

Martin M, Alcazar A, Salinas M (1990) Subcellular and regional distribution of casein kinase 2 and initiation factor 2 activities during rat brain development. *Int J Dev Neurosci* 8: 47-54

Martel V, Filhol O, Nueda A, Gerber D, Benitez MJ, Cochet C (2001) Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells. *Mol Cell Biochem* 227: 81-90

Mavlyutov TA, Cai Y, Ferreira PA (2002) Identification of RanBP2- and Kinesin-Mediated Transport Pathways with restricted neuronal and subcellular localization. *Traffic* 3: 630-40

Meek DW, Simon S, Kikkawa U, Eckhart W (1990) The p53 tumor suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *EMBO J* 9: 3253-60

Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Pinna LA, Issinger OG (1992) Role for the  $\beta$  subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur J Biochem* 204: 293-7

Meggio F, Marin O, Pinna LA (1994) Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* 40: 401-9

Meggio F, Pinna LA (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17: 349-68

Messenger MM, Saulnier RB, Gilchrist AD, Diamond P, Gorbsky GJ, Litchfield DW (2002) Interactions between protein kinase CK2 and Pin1. Evidence for phosphorylation-dependent interactions. *J Biol Chem* 277: 23054-64

Miyata Y, Yahara I (1992) The 90-kDa heat shock protein HSP90, binds and protects casein kinase 2 from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J Biol Chem* 267: 7042-7

Miyata Y, Yahara I (1995) Interaction between casein kinase 2 and the 90-kDa stress protein HSP90. *Biochemistry* 34: 8123-9

Münstermann U, Fritz G, Seitz G, Lu YP, Schneider HR, Issinger OG (1990) Casein kinase II is elevated in solid tumours and rapidly proliferating tissue. *Eur J Biochem* 189: 251-7

Mullis KB, Falcoona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350

Nakajo S, Hagiwara T, Nakaya K, Nakemura Y (1986) Tissue distribution of casein kinases. *Biochem Int* 13: 701-7

Nastainczyk W, Schmidt-Spaniol I, Boldyreff B, Issinger OG (1995) Isolation and characterization of a monoclonal anti-protein kinase CK2 beta-subunit antibody of the IgG class for the direct detection of CK2 beta-subunit in tissue cultures of various mammalian species and human tumors. *Hybridoma* 14: 335-9

- Niclas J, Navone F, Horn-Booher N, Vale RD (1994) Cloning and Localization of a Conventional Kinesin Motor Expressed Exclusively in Neurons. *Neuron* 12: 1059-72
- Niefind K, Guerra B, Pinna LA, Issinger OG, Schomburg D (1998) Crystal structure of catalytic subunits of protein kinase CK2 from Zea Mays at 2.1 Å resolution. *EMBO J* 17: 2451-62
- Niefind K, Putter M, Guerra B, Issinger OG, Schomburg D (1999) GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2 . *Natl struct Biol* 6: 1100-3
- Niefind K, Issinger OG (2005) Primary and secondary interactions between CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  lead to ring-like structures in the crystals of the CK2 holoenzyme. *Mol Cell Biochem* 274: 3-14
- Olsten MEK, Canton DA, Zhang C, Walton PA, Litchfield DW (2004) The pleckstrin homology domain of CKIP is required for interactions and recruitment of protein kinase CK2 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 279: 42114-27
- Orlandini M, Semplici F, Ferruzi R, Meggio F, Pinna LA, Oliviero S (1998) Protein kinase CK2 $\alpha$ ' is induced by serum as a delayed early gene and cooperates with Ha-ras in fibroblast transformation. *J Biol Chem* 273: 21291-7
- Pagano MA, Sarno S, Poletto G, Cozza G, Pinna LA, Meggio G (2005) Autophosphorylation at the regulatory subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* 274: 23-29
- Pepperkok R, Lorenz P, Jakobi R, Ansorge W, Pyerin W (1991) Cell growth stimulation by EGF: inhibition through antisense-oligodeoxynucleotides demonstrates important role of casein kinase II. *Exp Cell Res* 197: 245-53
- Pfister KK, Wagner MC, Stenoi DL, Brady ST, Bloom GS (1989) Monoclonal Antibodies to Kinesin Heavy and Light Chains Stain Vesicle-like Structures, but not Microtubules, in Cultured Cells. *J Cell Biol* 108: 1453-1463

Pinna LA (1990) Casein kinase 2: an eminence grise in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* 1054: 267-84

Pinna LA, Meggio F (1997) Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* 3: 77-97

Piston DW, Kremers GJ (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci* 32: 407-14

Prowald K, Fischer H, Issinger OG (1984) Enhanced casein kinase II activity in human tumour and cell cultures. *FEBS Lett* 176: 479-83

Pyerin W (1994) Human casein kinase 2: structures, genes, expression and requirement in cell growth stimulation. *Adv Enzyme Regul* 34: 225-246

Rahman A, Kamal A, Roberts EA, Goldstein LSB (1999) Defective Kinesin Heavy Chain Behavior in Mouse Kinesin Light Chain Mutants. *J Cell Biol* 146: 1277-88

Rethinaswami A, Birnbaum MJ, Glover CV (1998) Temperature-sensitive mutations of the CKA1 gene reveal a role for casein kinase II in maintenance of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 5869-77

Rodríguez F, Allende CC, Allende JE (2005) Protein kinase casein kinase 2 holoenzyme produced ectopically in human cells can be exported to the external side of the cellular membrane. *Proc Natl Acad Sci* 102: 4718-23

Rousseau I, Draetta G (1994) The *Schizosaccharomyces pombe* casein kinase II alpha and beta subunits: evolutionary conservation and positive role of the beta subunit. *Mol Cell Biol* 14: 576-86

Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Daena A, Shugar D, Pinna LA (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 496: 44-8

Sato-Yoshitake, R., Yorifuji, H., Inagaki, M. & Hirokawa, N. (1992) The Phosphorylation of Kinesin regulates its Binding to synaptic vesicles. *J Biol Chem* 267: 23930-36

Schief WR, Howard J (2001) Conformational changes during kinesin motility. *Curr Opin Cell Biol* 13: 19-28

Schuster N, Prowald A, Schneider E, Scheidtmann KH, Montenarh M (1999) Regulation of p53 mediated transactivation by the L-subunit of protein kinase CK2. *FEBS Lett* 447: 160-166

Schuster N, Götz C, Faust M, Schneider E, Prowald A, Jungbluth A, Montenarh M (2001) Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity. *J Cell Biochem* 81: 172-83

Schwindling SL, Noll A, Montenarh M, Götz C (2004) Mutation of a CK2 phosphorylation site in cdc25C impairs importin alpha/beta binding and results in cytoplasmic retention. *Oncogene* 23: 4155-65

Seldin DC, Leder P (1995) Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to Theileriosis in cattle. *Science* 267: 894-7

Serrano L, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J (1987) Tubulin phosphorylation by casein kinase II is similar to that found in vivo. *J Cell Biol* 105: 1731-9

Shimizu T, Thorn KS, Ruby A, Vale RD (2000) ATPase kinetic characterization and single molecule behavior of mutant human kinesin motors defective in microtubule-based motility. *Biochemistry* 39: 5265-73

Smith MJ, Pozo K, Kieran Brickley, Stephenson FA (2006) Mapping the GRIF-1 binding domain of the Kinesin, KIF5C, substantiates a role for GRIF-1 as an adaptor protein in the anterograde trafficking of cargoes. *J Biol Chem* 281: 27216-28

Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai L-H, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartelson C, Graves DJ, DeMeggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinase 1 and 2, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase, CDK5 and Erk1. *Mol Cell Biol* 16: 6486-93.

Stigare J, Buddelmejer N, Pigon A, Egyhazy E (1993) A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit. *Mol Cell Biochem* 91: 343-54

Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* 1978: 819-46.

Theis-Febvre N, Martel V, Laudet B, Souchier C, Grunwald D, Cochet C, Filhol O (2005) Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells. *Mol Cell Biochem* 274: 15-22

Tiganis T, House CM, Kemp BE (1993) Casein kinase II beta-subunit inhibits the activity of the catalytic alpha-subunit in the absence of salt. *Biochim Biophys Acta* 1203: 282-9

Ulloa L, Diaz-Nido J, Avila J (1993) Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells. *EMBO J* 12: 1633-40

Utton MA, Noble WJ, Hill JE, Anderton BH, Hanger DP (2005) Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J Cell Sci* 118: 4645-54

Vale RD, Reese TS, Sheetz MP (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39-50

Vale RD, Fletterick RJ (1997) The Design Plan of Kinesin Motors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 745-77

Valero E, De Bonist S, Filhol O, Wade RH, Langowski J, Chambaz EM, Cochet C (1995) Quarternary structure of Casein Kinase 2. *J Biol Chem* 270: 8345-52



Vallee RB, Sheptner HS (1990) Motor Proteins of cytoplasmic Microtubules. *Annu Rev Biochem* 59: 909-32

Vilk G, Saulnier RB, St. Pierre R, Litchfield DW (1999) Inducible Expression of Protein Kinase CK2 in Mammalian Cells Evidence for functional specialization of CK2 isoforms. *J Biol Chem* 274:14406–14414

Walter J, Schnölzer M, Pyerin W, Kinzel V, Kübler D (1996) Induced release of cell surface protein kinase yields CK1- and CK2-like enzymes in tandem. *J Biol Chem* 271: 111-9

Wilson LK, Dhillon N, Thorner J, Martin GS (1997) Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3. *J Biol Chem* 272: 12961-7

Xu X, Toselli AP, Russel LD, Seldin DC (1999) Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II  $\alpha'$  catalytic subunit. *Nat Genet* 23: 118-121

Yang JT, Laymon RA, Goldstein LSB (1989) A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* 56: 879-89

Yang JT, Saxton WM, Stewart RJ, Raff EC, Goldstein LS (1990) Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro. *Science* 249: 42-7

Yang-Feng TL, Zheng K, Kopatz I, Naiman T, Canaani (1991) Mapping of the human casein kinase II catalytic subunit genes: two loci carrying the homologous sequences for the  $\alpha$  subunit. *Nucleic Acids Res* 19: 7125-29

**Publikationen:**

Lehnert S, Götz C, Kartarius S, Schäfer B, Montenarh M (2007) Protein kinase CK2 interacts with the splicing factor hPrp3p. *Oncogene* (Epub ahead of print)

Schäfer B, Götz C, Montenarh M (2008) The kinesin I family member KIF5C is a substrate for protein kinase CK2. In preparation

Schäfer B, Götz C, Hessenauer A, Rettig J, Matti U, Trautmann R, Montenarh M (2008) KIF5C, a new binding partner for the catalytic subunits of protein kinase CK2. In preparation

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Mathias Montenarh am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar angefertigt. Die experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Februar 2005 bis Dezember 2007 durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Montenarh für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Diskussionsbereitschaft und fortwährende Unterstützung bei der Bearbeitung der Fragestellung.

Danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Zusammenarbeit, die große Hilfsbereitschaft und das sehr gute Arbeitsklima.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Lars Kästner und der ganzen Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Lipp für die stete Hilfe an den Mikroskopen.

Bei Herrn Dr. Oliver Wirths bedanke ich mich für die Bereitstellung der Rückenmarksschnitte und der Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Fluoreszenzfärbungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Ulf Matti und Frau Reiko Trautmann für die Bereitstellung der Neurone und der Hilfe bei technischen Fragen bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Ramona Gölzer für die Synthese der Peptide und Frau Sabine Pelvay für die Immunisierung und Blutentnahme des Kaninchens sowie Kaninchen 976 für das KIF5C-Serum.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zimmermann und Herrn Dr. Martin Jung für die stete Hilfe bei technischen Fragen danken.

Bei Herrn Prof. Nagase vom Kazusa Research Centre Japan bedanke ich mich für das KIF5C-Plasmid sowie bei Herrn Prof. Neil Cashman, Toronto für die NSC34 Zelllinie.

Bei Herrn Andreas Korbach bedanke ich mich für die moralische Unterstützung und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Studiumszeit unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Name	Barbara Schäfer
Adresse	Am Schulberg 2 66333 Völklingen
Telefon	06898-974770
Mobil	0170-6108867
Geburtsdatum	16. Februar 1979
Geburtsort	Völklingen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

## **Lebenslauf**

### **Schulbildung**

1985 – 1989	Schlossparkschule Geislautern
1989 – 1998	Warndtgymnasium Geislautern

### **Studium**

1998 – 2000	Grundstudium der Biologie an der Universität des Saarlandes
2001 – 2004	Hauptstudium der Biologie an der Universität des Saarlandes mit den Schwerpunkten 1. Genetik 2. Mikrobiologie 3. Virologie
September 2003 – Juli 2004	Diplomarbeit im onkologischen Labor (Innere Medizin I, Prof. Dr. M. Pfreundschuh) des Universitätsklinikums Homburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Renner Thema: „Die nähere Charakterisierung der Promotorregion des T-Zell-Aktivierungsgens RP1 und der transkriptionellen Modulatoren der Proteinfamilie BAG-1“
September 2004 – Dezember 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im onkologischen Labor (Innere Medizin I, Prof. Dr. M. Pfreundschuh) des Universitätsklinikums Homburg
Seit Februar 2005	Promotion im Fachbereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes in Homburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh Thema: „KIF5C, ein neuer Bindungspartner der Proteinkinase CK2“